

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“EXTRACCIÓN Y APLICACIONES  
ALIMENTARIAS DE MEMBRANAS DE  
CÁSCARAS DE HUEVO”**

**TRABAJO FIN DE MASTER  
POR**

**TANIA GARCÍA CAMPOS**

**JULIO, 2015**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Manuel Rendueles por la dirección del trabajo, por su inestimable ayuda y por el tiempo dedicado a corregir los fallos y solucionar los problemas surgidos en el transcurso del proyecto. De igual forma, agradecer a la Dra. Amanda Laca por su paciencia y su ayuda en tantas horas en el laboratorio, sin su experiencia y consejos el trabajo hubiese sido mucho más duro. No me olvido de sus ánimos y positivismo, tan de agradecer en algunos momentos.

A todos los profesores que en su momento me dieron clases, por dejar en mí parte de su conocimiento y contribuir en mi formación profesional y personal. Así como a los diferentes técnicos de los diferentes laboratorios, por invertir parte de su tiempo en aconsejarme y ayudarme siempre que fue necesario.

A mis compañeros de clase y de laboratorio, su compañía y apoyo fueron importantes en las muchas horas invertidas en el trabajo. Me llevo grandes momentos compartidos con ellos.

Y por último, y no por ello menos importante, a mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano y a Daniel, vuestro apoyo ha sido indispensable para superar con éxito esta etapa de mi vida.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>4</b>
2.1 Huevo de gallina .....	5
2.1.1 Clasificación del huevo en la Unión Europea.....	6
2.1.2 Estructura del huevo.....	8
2.2 Adsorción.....	14
2.2.1 Separación y purificación de proteínas .....	16
2.2.2 Isoterma de adsorción.....	19
2.2.3 Método de Lowry.....	22
2.3 Instrumentos analíticos. Espectrofotómetro. ....	22
2.3.1 Curvas de calibrado .....	24
2.4 Transglutaminasa .....	25
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Separación de la membrana de la cáscara de huevo.....	28
3.2 Tratamientos de la membrana .....	28
3.2.1 Membrana sin tratamiento (MST).....	29
3.2.2 Membrana sometida a tratamiento A (MTA) .....	29
3.2.3 Membrana sometida a tratamiento B (MTB).....	29
3.3 Liofilización.....	30
3.4 Caracterización de la membrana .....	31

3.4.1	Observación al microscopio electrónico de barrido (SEM)	31
3.4.2	Análisis termogravimétrico (TGA)	32
3.4.3	Porosimetría de intrusión de mercurio	32
3.4.4	Adsorción-desorción de nitrógeno	33
3.4.5	Determinación de proteínas: Método Kjeldahl	33
3.5	Ensayos experimentales	35
3.5.1	Capacidad de retención de proteínas	35
3.5.2	Capacidad de desorción de proteínas	41
3.6	Retención de cobre	41
3.7	Formación de geles	42
3.7.1	Transglutaminasa	42
3.7.2	Ácido oleico	43
3.7.3	Almidón y glicerol	44
3.7.4	Gelatina	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>46</b>
4.1	Microscopio electrónico de barrido (SEM)	47
4.1.1	Tratamiento A	47
4.1.2	Tratamiento B	50
4.2	Análisis termogravimétrico (TGA)	51
4.3	Porosimetría	53
4.4	Adsorción-desorción de nitrógeno	54
4.5	Determinación de proteínas	56
4.6	Capacidad de retención de proteínas	56
4.6.1	Ensayo I	57
4.6.2	Ensayo II	58
4.6.3	Ensayo III	59
4.6.4	Ensayo IV	60

4.6.5	Ensayo V.....	60
4.6.6	Ensayo VI.....	61
4.6.7	Ensayo VII.....	62
4.6.8	Ensayo VIII.....	63
4.6.9	Ensayo IX.....	64
4.6.10	Ensayo X.....	67
4.6.11	Ensayo XI.....	68
4.6.12	Ensayo XII.....	68
4.7	Capacidad de desorción de proteínas.....	70
4.7.1	Ensayo I.....	70
4.7.2	Ensayo II.....	71
4.7.3	Ensayo III.....	72
4.8	Retención de cobre.....	72
4.8.1	Ensayo I.....	72
4.8.2	Ensayo II.....	73
4.8.3	Ensayo III.....	73
4.9	Formación de geles.....	74
4.9.1	Transglutaminasa.....	74
4.9.2	Ácido oleico.....	75
4.9.3	Almidón y glicerol.....	77
4.9.4	Gelatina.....	77
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
	LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	81
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>

## RESUMEN

Debido a la importante actividad de la industria alimentaria en torno al huevo, se generan grandes cantidades de subproductos que hasta ahora han sido gestionados como desechos y que sin embargo pueden ser de alta utilidad. El objetivo por lo tanto de este proyecto es que uno de dichos residuos, como es la membrana que recubre a la cáscara de huevo en su capa interna, pueda ser reutilizada y revalorizada dentro de la propia industria alimentaria, y así de forma indirecta conseguir reducir el volumen de residuos que llegan a los vertederos con el consiguiente beneficio medioambiental y económico que esto conlleva.

Para ello y en primer lugar se realizó una caracterización físico-química de la membrana de la cáscara de huevo (contenido en proteínas, porosidad, resistencia térmica) con el fin de poseer una mayor información para su uso posterior. A continuación, y tras la aplicación de diferentes tratamientos, se han estudiado diversos campos en los que la membrana de la cáscara de huevo pueda aportar algún tipo de beneficio, entre los que destaca la formación de geles y la retención de cobre y proteínas.

Va a ser en esta última propiedad donde se han encontrado los mejores resultados, siendo la membrana de la cáscara de huevo un firme candidato como adsorbente natural de proteínas, con posibles utilidades en el campo de la alimentación, concretamente evitando la pérdida de proteínas en las corrientes residuales de clara de huevo. Como punto negativo, destacar que la adsorción de las proteínas en la superficie de la membrana es irreversible, por lo que quedaría por desarrollar un método que permitiese la elución de dicha proteína para su posterior purificación.

## **ABSTRACT**

Due to the important food industry activity around the egg, large amount of by-products are generated, which have been managed as waste until now and nevertheless can be highly useful. Therefore, the aim of this project is that one of these residues, as the eggshell membrane is, could be reused and revalued within the food industry itself, and thus achieve to reduce the waste volume going to landfill, with the consequent environmental and economical benefit that entails.

For this, firstly it was performed a physico-chemical characterisation of the eggshell membrane (content of protein, porosity, thermal resistance), with the purpose of obtaining more information for later use. Next, after the implementation of different treatments, it has been studied different fields in which eggshell membrane could provide some type of benefit, standing out gels creation and copper and protein retention.

It is in this last property, where the best results have been found, so that eggshell membrane constitutes a strong candidate as a protein natural adsorbent, with possible food field applications, specifically avoiding protein loss in the egg white residual currents. As a negative point, it has to be highlight that protein adsorption in the egg shell membrane surface is irreversible, so that it would be necessary to develop a method which allows the elution of this protein for later purification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clases de huevo en función de su peso.....	7
Figura 2. Principales partes del huevo.....	9
Figura 3. Imagen de la cáscara del huevo, cutícula y membrana.....	10
Figura 4. Imagen correspondiente a la cámara de aire .....	11
Figura 5. Esquema que muestra la disposición de la cáscara, las membranas y la cutícula .....	12
Figura 6. Imagen donde se aprecia la cáscara de huevo y la membrana externa adherida a ella.....	14
Figura 7. Esquema descriptivo de adsorción-desorción.....	18
Figura 8. Clasificación de las isothermas de adsorción según la IUPAC.....	20
Figura 9. Componentes básicos de un instrumento analítico.....	23
Figura 10: Representación gráfica de la recta de calibrado en un método de retención de proteínas.....	25
Figura 11. Esquema resumen de los diferentes tratamientos aplicados a las membranas de la cáscara de huevo.....	30
Figura 12. Membrana dispuesta a ser liofilizada.....	31
Figura 13. Porosímetro de intrusión de mercurio.....	32
Figura 14. Porosímetro de intrusión de mercurio.....	33
Figura 15. Esquema resumen de las diferentes fases en las que se divide el método Kjeldahl.....	35
Figura 16. Matraz kitasato conectado a la bomba de vacío.....	37
Figura 17. Agitador-incubador New Brunswick scientific, modelo Excella E24.....	38
Figura 18. MPTA al microscopio electrónico de barrido. Aumento a 100x (escala: 100 $\mu\text{m}$ ).....	47
Figura 19. MPTA al microscopio electrónico de barrido. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).....	47
Figura 20. Detalle de una zona visiblemente más compacta de la MPTA. Aumento 250x (escala: 100 $\mu\text{m}$ ).....	48
Figura 21. Detalle de una zona visiblemente más compacta de la MPTA. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).....	48

Figura 22. Detalle de una zona con mezcla de parte fibrosa y parte más compacta de MPTA. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).	48
Figura 23. MGTA al microscopio electrónico de barrido. Aumento 50x (escala: 500 $\mu\text{m}$ ).	48
Figura 24. Detalle de una zona de MGTA donde se ve zona tamizada (fibrosa) y zona no tamizada (lisa). Aumento 250x (escala: 100 $\mu\text{m}$ ).	49
Figura 25. Detalle de zona fibrosa de MGTA. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).	49
Figura 26. Detalle de las fibras que componen la MTA. Aumento 15000x (escala: 1 $\mu\text{m}$ ).	49
Figura 27. Detalle de una zona con mezcla de parte fibrosa y parte más compacta de MGTA. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).	49
Figura 28. MPTB al microscopio electrónico de barrido. Aumento 100x (escala: 100 $\mu\text{m}$ ).	50
Figura 29. MPTB al microscopio electrónico de barrido. Aumento 250x (escala: 100 $\mu\text{m}$ ).	50
Figura 30. Detalle de las fibras que componen MPTB. Aumento 1000x (escala 10 $\mu\text{m}$ ).	50
Figura 31. Detalle de las fibras que componen MPTB. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).	50
Figura 32. Detalle de las fibras que componen MPTB. Aumento 1000x (escala: 10 $\mu\text{m}$ ).	51
Figura 33. Gráfica que muestra la respuesta de la muestra al incremento de temperatura.	52
Figura 34. Gráfica de porosidad correspondiente a la superficie de MPTA.	53
Figura 35. Clasificación de poros de la IUPAC.	53
Figura 36. Gráfica ASAP de MPTA.	54
Figura 37. Gráfica ASAP de MPTB.	54
Figura 38. Tipos de isothermas según la clasificación BDDT.	55
Figura 39. Recta de calibrado típica. Obtenida en el ensayo I.	58
Figura 40. Representación de la concentración en equilibrio frente al tiempo.	65
Figura 41. Representación de la capacidad de retención frente al tiempo.	65
Figura 42. Representación de la concentración en equilibrio frente al tiempo.	66
Figura 43. Representación de la capacidad de retención frente al tiempo.	67

Figura 44. Isotherma de Langmuir para 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. ....	69
Figura 45: Imagen de la estructura tipo gel generada en los ensayos B y C. ....	75
Figura 46. Material obtenido al finalizar el ensayo I. ....	76
Figura 47. Material obtenido al finalizar el ensayo. ....	77

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proporciones de agua y patrón (BSA) que son necesarios para la generación de la recta patrón.....	40
Tabla 2. Resumen esquemático de los diferentes ensayos llevados a cabo.....	43
Tabla 3. Área BET obtenida según el tratamiento aplicado. ....	55
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenido con el método Kjeldahl. ....	56
Tabla 5. Resumen de todos los ensayos realizados para determinar la capacidad de retención de proteínas .....	57
Tabla 6. Resumen de resultados obtenidos en el ensayo I. Siendo $C_i$ la concentración de proteína inicial; $C_{eq}$ la concentración de proteína en el equilibrio y $Q$ la capacidad de retención de proteína por parte de la membrana.....	58
Tabla 7. Resumen de resultados obtenidos en el ensayo II. ....	59
Tabla 8. Resumen de resultados obtenidos en el ensayo III. ....	59
Tabla 9. Resumen de resultados obtenidos en ensayo IV.....	60
Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos en ensayo V.....	61
Tabla 11. Resultados obtenidos en el ensayo VI.....	62
Tabla 12. Resultados obtenidos en ensayo VII.....	62
Tabla 13. Resultados obtenidos en el ensayo VIII.....	63
Tabla 14. Resultados obtenidos en el ensayo IX, para una disolución de OVA de 300 ppm.....	64
Tabla 15. Resultados obtenidos en el ensayo X, para una disolución de OVA de 500 ppm.....	66
Tabla 16. Resultados obtenidos en el ensayo X.....	67
Tabla 17. Resultados obtenidos en el ensayo XI.....	68
Tabla 18. Resultados obtenidos con una concentración de OVA de 50 ppm. ....	69
Tabla 19. Resultados obtenidos con una concentración de OVA de 100 ppm. ....	69
Tabla 20. Resultados de desorción obtenidos empleando membranas que habían retenido a diferentes concentraciones. ....	71
Tabla 21. Resultados de desorción obtenidos empleando membranas que habían retenido a diferentes concentraciones. ....	71

Tabla 22. Resultados obtenidos en el ensayo I. ....	72
Tabla 23. Resultados obtenidos en el ensayo II. ....	73
Tabla 24. Resultados obtenidos en el ensayo III. ....	74
Tabla 25. Cantidades empleadas en los diferentes ensayos. ....	74
Tabla 26. Cantidades empleadas en los diferentes ensayos. ....	75

# ***1 INTRODUCCIÓN***

Según la Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas (FIAB), la industria alimentaria ha llegado casi a duplicar su nivel de actividad en los últimos trece años, pasando de representar el 13,7% de la industria manufacturera en el año 2000 al 22,5% en el 2013.

Esto se traduce en la generación de una elevada cantidad de subproductos y excedentes de la industria agroalimentaria que son susceptibles de ser aprovechados y, sin embargo, son desechados por falta de usos viables convirtiéndose en residuos industriales. Al mismo tiempo, el tratamiento de dichos residuos resulta muy costoso para las empresas, además de constituir un importante problema medioambiental debido principalmente a su volumen, pues si bien son productos que inicialmente no contienen compuestos de alto riesgo medioambiental, la producción y acumulación de los mismos en grandes volúmenes puede plantear problemas de gestión.

Uno de los principales motivos de este incremento en la industria alimentaria es el enorme crecimiento de la población humana, lo que implica un incremento de la demanda de alimentos y por lo tanto una aceleración importante en la generación de residuos. Dicha población es la que a su vez, se ve afectada directamente por este exceso de residuos, pues la contaminación de aguas y suelos, así como la atmosférica es el precio que se está pagando por desechar subproductos potencialmente revalorizables.

Es por todo esto, por lo que se necesita buscar alternativas al tratamiento de los residuos y subproductos que se generan, siendo muchos de ellos fuentes potenciales de productos de alto valor añadido, para los cuales ha de encontrarse el proceso adecuado de revalorización y reciclaje.

En el caso concreto del huevo, se trata de uno de los alimentos más importantes dentro de la dieta de los consumidores de casi todo el mundo, generándose tan solo en el mercado español unos 1.040 millones de docenas al año (Fernández et al., 2014). El motivo, es su alto valor nutritivo así como sus numerosas cualidades organolépticas

(Anton et.al., 2000) que aportan una amplia gama de propiedades funcionales muy apreciadas en la cocina, que hacen de él un básico en la gastronomía española. Además tradicionalmente ha sido un alimento muy apreciado, pues en tiempos de escasez, al ser considerado muy nutritivo, se guardaban los huevos para las personas que más los necesitaban (niños, ancianos, enfermos, embarazadas) a modo de reconstituyente y en las mesas de los grandes señores era un manjar muy apetecible ya que ofrecía numerosas posibilidades para su disfrute gastronómico (Instituto de estudios del huevo, 2009).

A comienzos del siglo XXI en España el censo de gallinas ponedoras supera los 40 millones, que producen más de 1000 millones de docenas de huevos al año. España es uno de los principales productores de huevos de la Unión Europea y abastece su demanda interior además de comercializar también en el mercado exterior (principalmente intracomunitario) parte de su producción (Instituto de estudios del huevo, 2009).

Teniendo en cuenta que uno de los principales residuos que genera la industria relacionada con los ovoproductos es la cáscara de huevo a la que va adherida la membrana (cada año en España se generan unas 17.000 toneladas de cáscara de huevo cuyo final suele ser el vertedero (<http://cincodias.com>)), parece razonable que la búsqueda de una aplicación alimentaria para ésta sea motivo de interés. Y por lo tanto, es este el principal objetivo de este trabajo, investigar posibles aplicaciones de las membranas de las cáscaras de huevo, para sacar un beneficio económico e industrial de un material que termina en un porcentaje muy elevado en los vertederos. De esta manera y de forma añadida se consigue reducir la contaminación ambiental generada por acumulación de estos productos, así como el impacto negativo que puede ejercer sobre la población. Además, los costes que implican su transporte y gestión medioambiental también se ven reducidos, con el consiguiente beneficio económico para el sector.

## ***2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS***

## 2.1 Huevo de gallina

Según la Real Academia Española, el huevo es un "cuerpo redondeado, de tamaño y dureza variables, que producen las hembras de las aves o de otras especies animales, y que contiene el germen del embrión y las sustancias destinadas a su nutrición durante la incubación". Habitualmente y en el lenguaje corriente, cuando se habla de huevo se hace referencia al de gallina, pues es el que de forma principal es consumido en la alimentación humana.

Los huevos objeto de estudio en este proyecto son por lo tanto, huevos de gallina (*Gallus domesticus*). La utilización de estos y no otros, se debe principalmente a que su uso es el más extendido a nivel global, tanto para consumo en fresco como para la elaboración de ovoproductos así como ingrediente alimentario.

El huevo tiene una estructura compleja derivada de su función reproductiva. Pues está preparado para albergar y alimentar durante el tiempo que dura la incubación (21 días) al embrión que se desarrolla dentro de la gallina y que da lugar a un nuevo individuo. Los huevos comerciales (no fecundados, y por lo tanto sin embrión) contienen el óvulo, que es la yema, protegido por la clara, la cáscara y las membranas (Instituto de estudios del huevo, 2009).

Nutricionalmente el huevo de gallina es uno de los alimentos más completos y versátiles que existen para el ser humano. Es una excelente fuente de proteínas de alta calidad, pues contienen todos los aminoácidos esenciales necesarios y en las proporciones adecuadas para la construcción y reparación de las células de los tejidos que componen el organismo. También es una fuente importante de ácidos grasos mono y poliinsaturados, colesterol, vitaminas y minerales, y además se trata de un alimento de bajo coste, fácil de preparar y con bajo contenido calórico (~70 Kcal). Estas importantes propiedades nutricionales hacen que sea ampliamente utilizado en la industria alimentaria, y lo hace ideal para el consumo humano, en especial para aquellas personas con necesidades dietéticas específicas (Abdou et al., 2013).

Los componentes primarios del huevo corresponden a 12% de proteínas, 12% de lípidos y un 75% de agua con pequeñas cantidades de hidratos de carbono y minerales. Las proteínas del huevo se encuentran distribuidas en un 40% en la yema, en un 50% en la clara y la cantidad restante se encuentra en la cáscara de huevo y en las membranas. Los lípidos están principalmente en la yema de huevo, en forma de lipoproteínas y el 40% de los hidratos de carbono se encuentran contenidos en la yema en forma libre, o unidos a lípidos y proteínas. El mayor contenido de pigmentos se encuentra en la yema, cuyo color es considerado un parámetro de calidad. La mayoría de los minerales están presentes en forma conjugada y solo una mínima fracción se encuentra como compuestos inorgánicos o iones. Aproximadamente el 94% del contenido mineral está en la cáscara (Surgino et al., 1997).

Para su consumo, es necesario que el huevo de gallina sea de primera calidad, siendo fundamental la selección de una buena raza de gallina, una buena alimentación de estas y una producción en condiciones sanitarias óptimas (Rendueles, 2014).

Una vez puestos, los huevos deberán ser recogidos, lavados, clasificados, envasados y almacenados a unos 10°C o procesados. Toda esta operación se debe realizar en el menor tiempo posible para evitar así la pérdida de calidad de la proteína. La limpieza se realiza por vía húmeda o seca. La clasificación se realiza en función del peso; existen distintos grados que van desde 50 hasta más de 70 g. El almacenamiento se realiza en cámaras que no deberán tener elevada humedad, aunque tampoco muy baja, para evitar una excesiva desecación; lo ideal sería entre un 75-80% de humedad. Al huevo se le puede dar antes de almacenar una cubierta tenue de aceite para sellar los poros de la cáscara, evitando la pérdida de humedad y CO<sub>2</sub>; esto hace que el pH del albumen suba más despacio, evitando el deterioro de la membrana de la yema y el adelgazamiento de la clara que ocurre a pH altos (Rendueles, 2014).

### **2.1.1 Clasificación del huevo en la Unión Europea**

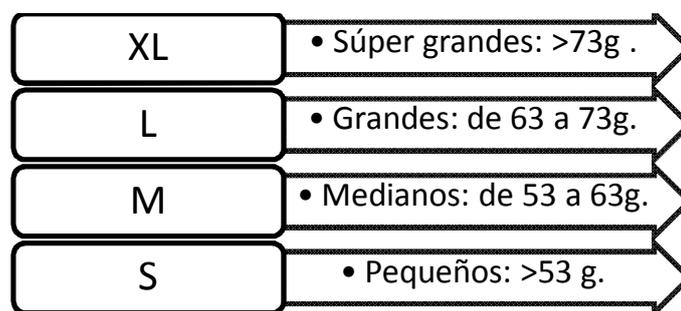
Los huevos que se venden en la Unión Europea deben cumplir los reglamentos comunitarios sobre su comercialización así como las normas nacionales aplicables. Esta

legislación define los criterios de calidad, de peso, de frescura, de envasado y de etiquetado.

Tras su puesta, llegan al centro de clasificación y envasado donde son seleccionados. Se consideran aptos para el consumo humano directo, los huevos frescos denominados huevos de *categoría A*, que han de cumplir una serie de requisitos como que la cáscara y la cutícula han de estar en perfectas condiciones, limpias e intactas, que la cámara de aire no debe tener una altura mayor de 6 mm, y en el caso concreto de los huevos comercializados con la mención “EXTRA” no podrá ser superior a los 4 mm. La clara ha de ser transparente, sin manchas, de consistencia gelatinosa y exenta de materias extrañas de cualquier tipo. La yema además no solo deber ser visible al trasluz como una sombra, sino que no se debe separar del centro al someter al huevo a un movimiento de rotación y no debe tener ningún material extraño en su interior. El germen tiene que tener un desarrollo imperceptible, y no debe existir ningún tipo de olor extraño (Instituto de estudios del huevo, 2009).

Los huevos frescos no se lavan ni se limpian por otros procedimientos antes o después de la clasificación. Tampoco se someten a ningún tratamiento de conservación ni refrigeración a temperaturas inferiores a 5 °C.

Los huevos frescos destinados para su consumo como huevos de mesa se clasifican en función de su peso en cuatro clases, XL, L, M y S (*Figura 1*).



*Figura 1. Clases de huevo en función de su peso.*

Una vez que el huevo ha sido seleccionado y clasificado, se envasa. Los embalajes de los huevos deben ser resistentes a golpes, estar secos, limpios y en buen estado.

Están fabricados con materiales que protegen a los huevos de olores extraños y de posibles alteraciones de la calidad (Instituto de estudios del huevo, 2009).

Un huevo fresco debe venderse al consumidor en los 21 días posteriores a la fecha de puesta, aunque se puede consumir hasta la fecha de consumo preferente indicada en el estuche (28 días desde el día de la puesta). Los envases de huevos frescos deben presentar toda esta información de forma legible y en un lugar visible.

Los huevos que no cumplen los requisitos para ser de categoría A se clasifican como de *categoría B*. Los que son aptos para el consumo humano pueden destinarse a la elaboración de ovoproductos en las industrias alimentarias autorizadas. Los huevos de categoría B que no son aptos para el consumo humano se derivan a usos no alimentarios o se destruyen.

### **2.1.2 Estructura del huevo**

El huevo se encuentra protegido de la contaminación exterior por la barrera física que le proporcionan su cáscara y sus membranas y por la barrera química que le proporcionan los componentes antibacterianos presentes en su contenido.

En el corte transversal de un huevo se pueden apreciar de forma clara sus partes: la cáscara, la clara o albumen y la yema, separadas entre sí por medio de membranas que mantienen su estructura e integridad (*Figura 2*).

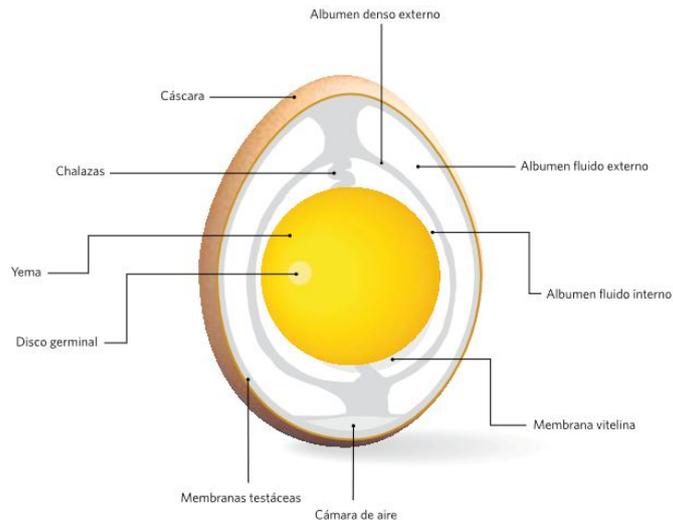


Figura 2. Principales partes del huevo (Instituto de estudios del huevo, 2009)

El peso medio de un huevo está entre los 50 y 63 g, de los cuales aproximadamente la clara representa el 60-63%, la yema el 28-39% y la cáscara, junto a las membranas, el 10% del total, siendo la membrana de la cáscara del huevo el 0.7%.

A continuación se va a detallar cada una de las partes que conforma el huevo.

- **Cáscara**

La cáscara es la cubierta exterior del huevo y tiene gran importancia, puesto que mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Su grosor es de aproximadamente 0.35 mm, lo que garantiza menos del 50% de las roturas en la manipulación (huevos con un espesor de cáscara inferior a 0.30 mm son poco apropiados para la comercialización debido a su fragilidad). Está constituida en su mayor parte, por una matriz cálcica con un entramado orgánico, en el que el calcio es el elemento más abundante (94%) y de mayor importancia. Aunque en menor proporción, también se encuentran en su composición otros minerales como son el sodio, el magnesio (proporciona dureza), el zinc, el manganeso, el hierro, el cobre, el aluminio y el boro. Además posee pequeñísimas cantidades de mucopolisacáridos y proteínas que van a contribuir a formar el entramado de la matriz. La matriz tiene dos zonas: la inferior, en contacto con las membranas y la superior o exterior, cuyas fibras corren

paralelas a la superficie de la cáscara (Tsai et al., 2005, Instituto de estudios del huevo, 2009 y Rendueles,2014).

La cáscara está construida de tal manera que tiene numerosas aberturas circulares, denominadas *poros*, que permiten el intercambio gaseoso (tanto de vapor de agua como de CO<sub>2</sub>) entre el interior y el exterior. Su número varía entre 7000 y 15000. Son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo, donde aparece la cámara de aire.

Toda la superficie de la cáscara, incluidos los poros, se encuentra recubierta por una *cutícula* orgánica (10-20 µm de grosor) (Figura 3) que contiene la mayoría de los pigmentos de la cáscara y que está formada principalmente por proteínas (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. La principal función de esta película consiste en cerrar los poros, formando una barrera física contra la penetración de microorganismos. También evita la pérdida de agua (Anton et al., 2007 e Instituto de estudios del huevo, 2009).

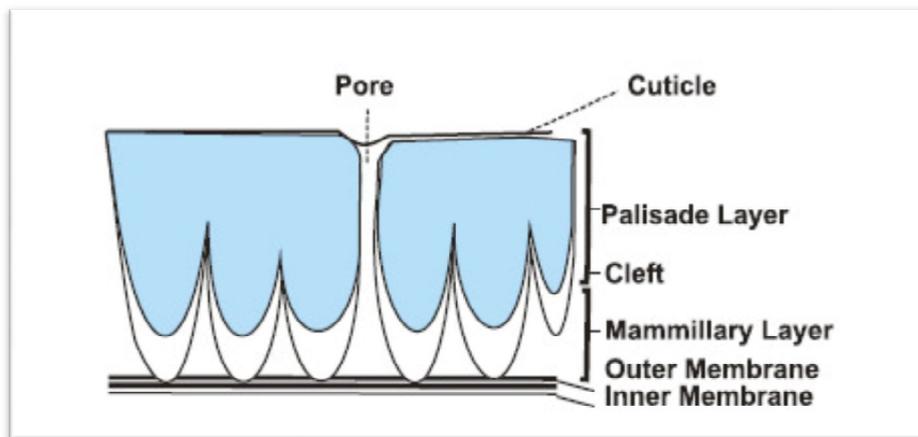


Figura 3. Imagen de la cáscara del huevo, cutícula y membrana (Gupta et al., 2008)

- **Membranas testáceas**

La cáscara está recubierta en su parte interna por dos membranas (Figura 3), la *membrana testácea* interna y la externa (Figura 5). Ambas rodean el albumen y proporcionan protección contra la penetración bacteriana. Las membranas testáceas se

encuentran fuertemente pegadas entre sí cuando el huevo es puesto por la gallina. Tras la puesta, debido a la contracción del volumen del contenido del interior del huevo al enfriarse (la temperatura del huevo recién puesto es de 39 °C) penetra aire en el polo grueso, por su mayor concentración de poros, y se separan en esta zona las membranas para constituir la cámara de aire (*Figura 4*). A medida que el huevo pierde frescura, pierde también agua en forma de vapor a través de los poros de la cáscara y la cámara de aire se expande, por lo tanto, la altura de la cámara de aire es una de las medidas de la frescura de un huevo en términos de calidad, independientemente de los días transcurridos tras la puesta. Los huevos de *categoría A* deben tener una altura de la cámara de aire no superior a 6 mm ([Instituto de estudios del huevo, 2009](#)).



*Figura 4. Imagen correspondiente a la cámara de aire ([www.unioviedo.es](http://www.unioviedo.es)).*

La membrana interna tiene una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas que impiden la entrada de algunos microorganismos y retarda la entrada de otros. La membrana externa es mucho más porosa y sirve como asentamiento para la formación de la cáscara.

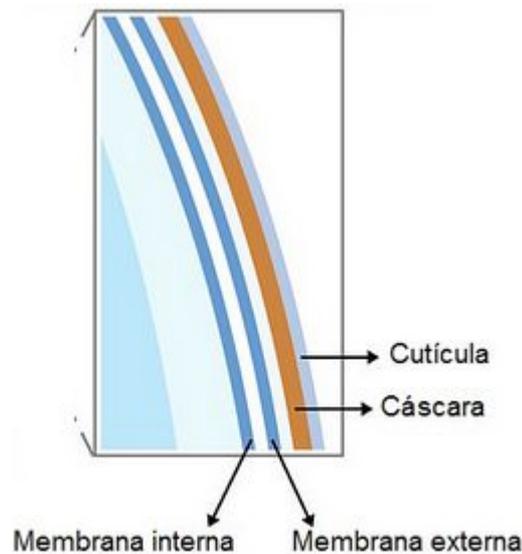


Figura 5. Esquema que muestra la disposición de la cáscara, las membranas y la cutícula.

([www.gallosedragliofarm.com](http://www.gallosedragliofarm.com))

- **Clara o albumen**

En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albumen denso y el albumen fluido. El albumen denso rodea a la yema y es la principal fuente de *riboflavina* y de proteína del huevo. El albumen fluido es el más próximo a la cáscara.

La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (cerca del 12%) que suponen algo más de la mitad de las proteínas totales del huevo. La proteína más importante, no solo en términos cuantitativos (54% del total proteico), es la *ovoalbúmina*, cuyas propiedades son de especial interés tanto desde el punto de vista nutritivo como culinario. También está presente la *lisozima* que impide y/o retarda el paso de algunos microorganismos al interior del huevo. Está exenta de lípidos. Las vitaminas B2 y niacina están en mayor cantidad en la clara que en la yema ([Instituto de estudios del huevo, 2009](#)).

#### Ovoalbúmina

La ovoalbúmina es la proteína predominante en el albumen, pues supone el 54% del peso total de las proteínas presentes en dicha estructura del huevo. Es una

fosfoglicoproteína perteneciente a la familia de las serpinas (grupo amplio de proteínas cuyo nombre deriva de serina proteasa inhibidora en virtud de sus propiedades funcionales). Posee una masa molecular de 45 KDa y está formada por una secuencia de 385 aminoácidos. Cuando está en solución acuosa puede desnaturalizarse y agregarse debido a tratamientos térmicos o por exposición a interfases aire-agua (Anton et al., 2007).

Su gran disponibilidad ha permitido su uso amplio como preparación estándar en diversos estudios sobre estructura y propiedades de las proteínas, así como en modelos experimentales relacionados con alergias, pues tiene un papel importante en relación con las alergias provocadas por el huevo.

- **Yema o vitelo**

La yema es la parte central y anaranjada del huevo. Está rodeada de la membrana vitelina, que da la forma a la yema y permite que esta se mantenga separada de la clara o albumen. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%.

Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y *carotenoides*. Estos últimos son compuestos de efecto antioxidante y los responsables del color amarillo, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina.

En su interior se encuentra el disco germinal o *blastodisco*, que es un pequeño disco claro en la superficie de la yema, lugar en el que se inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado.

- **Membrana de la cáscara de huevo**

Como se ha mencionado antes, entre la clara del huevo (albumen) y la superficie interna de la cáscara coexisten dos tipos de membranas, una más gruesa y externa unida

a la cáscara ( $\sim 50-70 \mu\text{m}$ ) (*Figura 6*) y una más fina e interna, que tras la ruptura del huevo se queda unida a la yema ( $\sim 15-26 \mu\text{m}$ ). El espesor total de ambas es aproximadamente  $100 \mu\text{m}$ . Cada una de estas membranas, está compuesta por fibras proteicas que están dispuestas formando una membrana semipermeable que se mantiene estable en solución acuosa ([Antón et al., 2007](#) y [Tang et al., 2009](#)).



*Figura 6. Imagen donde se aprecia la cáscara de huevo y la membrana externa adherida a ella.*

La membrana de la cascara de huevo posee una compleja red reticular de fibras estables que generan un área de superficie grande, al mismo tiempo de poseer una excelente permeabilidad a los gases y al agua, así como a pequeñas moléculas. Esta red está formada principalmente por *colágeno* tipo I, V y X, que supone el 88-96% del total de su peso seco. También se conoce la presencia de otras proteínas como pueden ser la *osteopontina*, *sialoperoteína* y *queratina* ([Antón et al., 2007](#); [Yu et al., 2012](#) y [Torres et al., 2010](#)).

## **2.2 Adsorción**

La adsorción es una operación de separación en la que ciertos componentes de una fase fluida (átomos, iones o moléculas) se transfieren hacia la superficie de un sólido, donde quedan unidos mediante fuerzas de naturaleza física (débiles) o bien mediante verdaderos enlaces químicos.

La sustancia que se concentra en la superficie o se adsorbe se llama "adsorbato" y la fase adsorbente se llama "adsorbente". El componente eliminado por adsorción de una mezcla gaseosa o líquida puede ser el producto deseado, pero también una impureza. Es importante destacar que la adsorción es un fenómeno de superficie, concepto totalmente diferente al de absorción, que es un proceso en el cual las moléculas o átomos de una fase interpenetran casi uniformemente en los de otra fase constituyéndose una "solución" con esta segunda.

Los procesos de adsorción presentan una serie de ventajas frente a otros métodos de retención, como es que no dan lugar a subproductos de reacción, su sencillez en diseño y operación y su insensibilidad a sustancias tóxicas. El sólido universalmente utilizado en el tratamiento de aguas es el *carbón activo*, que ha sido empleado entre otras muchas cosas, en el tratamiento de aguas para la eliminación de compuestos fenólicos en bajas concentraciones y la eliminación de contaminantes emergentes, pero su uso se ve restringido por los elevados costes. Además, el carbón activo una vez saturado, durante el proceso de regeneración en un horno se deteriora y pierde capacidad de adsorción, por lo que es necesario reponer parte del mismo por carbón virgen en cada ciclo (López, 2014).

Dado que el coste es un parámetro importante a la hora de la elección del adsorbente, han surgido alternativas al carbón activo como son las zeolitas, las arcillas (montmorillonita, bentonita) y los denominados adsorbentes de bajo coste, procedentes en su mayor parte de residuos sólidos orgánicos. Es este último punto, en el que se incluye la membrana de la cáscara de huevo, y el que centrará la atención en este trabajo.

Algunas de las posibles aplicaciones de los adsorbentes procedentes de residuos sólidos orgánicos están relacionadas con su capacidad para ofrecer una elevada superficie de contacto sólido-fluido, como pueden ser la recuperación de disolventes, el control de las emisiones de vapores de gasolina, el control de gases industriales, la separación de gases, la eliminación de olores en depuradoras de aguas residuales o soporte de catalizadores. También es posible su uso en el tratamiento de aguas (potables y residuales), decoloración de edulcorantes, purificación de productos químicos y

farmacéuticos y procesos en la industria alimentaria. En este último punto es donde va a tener cabida la separación y purificación de proteínas (López, 2014).

### **2.2.1 Separación y purificación de proteínas**

La separación y purificación de proteínas es un pre-requisito indispensable para su utilización en biomedicina e industrias farmacéuticas y alimentarias. Para la obtención de proteínas purificadas ya existen diversos métodos de separación, incluyendo precipitación, adsorción y electroforesis. Entre estos métodos, la adsorción ha sido extensamente utilizada en la separación de proteínas debido a su gran eficiencia económica, su rapidez y su sencillez de trabajo. En consecuencia, una gran variedad de materiales, incluyendo componentes orgánicos e inorgánicos han sido desarrollados como adsorbentes para la separación de proteínas (Li et al., 2013).

Aunque los adsorbentes actuales muestran un rendimiento significativo en la separación de proteínas, la aplicación práctica de dichos materiales puede suponer un desafío por varios motivos. El primero de ellos es el empleo de compuestos tóxicos en la preparación de los adsorbentes, como pueden ser algunos monómeros o activadores tóxicos (carbón activo). En segundo lugar, la proteína diana puede ser irreversiblemente adsorbida en el adsorbente debido a fuertes interacciones, lo que se traduce en una baja recuperación de dicha proteína. Y en último lugar, algunos materiales poseen una limitación en transferencia de masas. Por lo tanto, es altamente deseable encontrar nuevos materiales adsorbentes para la separación de proteínas que no posean ninguno de estos inconvenientes (Li et al., 2013).

Es por eso que uno de los propósitos que se han barajado en este proyecto, es averiguar si las membranas de cáscara de huevo son capaces de retener proteína, pues con vistas a su aplicación en la industria alimentaria sería una característica muy interesante a tener en cuenta, pues el hecho de que un material de procedencia animal como es la membrana se pueda emplear para separar proteínas a nivel alimentario, hace que los aspectos perjudiciales mencionados con anterioridad, desaparezcan.

Además, las fibras de colágeno que componen la membrana de la cáscara de huevo, son uno de los biopolímeros naturales más abundantes, y poseen una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como baja toxicidad e hidrofiliidad. Por lo tanto, supone un candidato prometedor para el desarrollo de nuevos materiales para la separación de proteínas (Li et al., 2013).

Las fibras de colágeno pueden tener cargas positivas o negativas dependiendo del pH circundante y por lo tanto pueden unirse selectivamente con proteínas basándose en uniones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre dichas fibras de colágeno y la superficie de las proteínas a separar. También se sabe, gracias a investigaciones previas, que la fibra de colágeno muestra una alta transferencia de masa así como una alta recuperación de los objetos de separación, en este caso las proteínas. Como consecuencia, es posible en principio, usar fibra de colágeno como adsorbente para la separación de proteínas. Sin embargo, la fibra de colágeno natural es fácilmente atacada por productos químicos y bacterias. Así que una adecuada modificación de la fibra de colágeno, como por ejemplo un entrecruzamiento con glutaraldehído se hace necesario, con el fin de mejorar su estabilidad y su resistencia térmica (Li et al., 2013).

Dentro del fenómeno de adsorción, se pueden distinguir dos comportamientos distintos denominados fisisorción y quimisorción, aunque es frecuente observar comportamientos intermedios. Se describirán brevemente cada uno de ellos, enunciando las grandes propiedades que los caracterizan así como las principales diferencias existentes entre ellos (De Santiago, 2012).

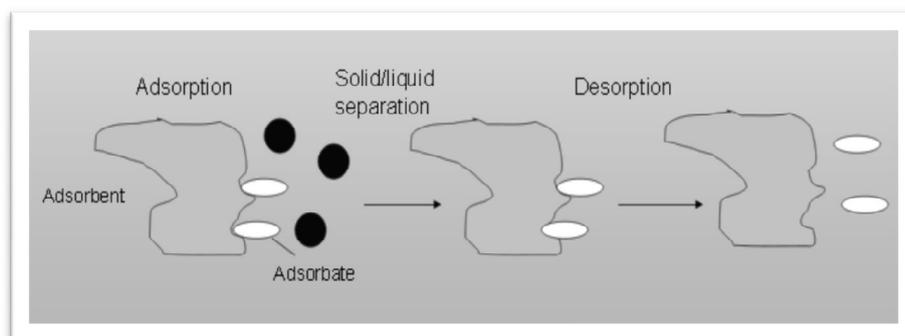
- Adsorción física o fisisorción:

En la adsorción física o fisisorción las moléculas se mantienen unidas a la superficie del sólido por medio de fuerzas de *Van der Waals*, por lo que se trata de una interacción adsorbato-adsorbente débil que suele producirse en multicapas, donde además no existe entre ellos (adsorbato y adsorbente) una gran selectividad. Es también un proceso exotérmico además de no específico, puesto que las fuerzas que intervienen no lo son. La molécula fisiosorbida mantiene su identidad ya que la energía es insuficiente para romper el enlace, aunque su geometría puede estar distorsionada (De Santiago, 2012).

- Adsorción química o quimisorción:

Fue propuesta por *Langmuir* en 1916. En este caso las moléculas se mantienen unidas a la superficie formando un enlace químico fuerte. Se trata de una interacción más fuerte que la fisisorción y sus entalpías además son mucho mayores. La quimisorción es específica y dado que implica la formación de un enlace entre el adsorbato y el adsorbente, el proceso se detiene tras la formación de una monocapa sobre la superficie. Aunque solo una capa pueda estar quimisorbida puede producirse adsorción física de nuevas capas de adsorbato sobre la primera. En general implica la rotura y formación de enlaces, por lo que la molécula adsorbida no mantiene la misma estructura electrónica.

La *desorción* es por definición el proceso inverso a la adsorción, puesto que se trata del fenómeno por el que una molécula adsorbida en la superficie de un sólido se desprende de la superficie y vuelve al seno del fluido (*Figura 7*), como respuesta a un cambio en el medio. Es decir, si la adsorción implicaba un aumento en la cantidad de soluto adsorbido, la desorción se traduce en una disminución del número de moléculas adsorbidas en superficie como consecuencia de un cambio producido en el medio. En algunos casos, la adsorción es un proceso totalmente reversible y las moléculas sufren una desorción en condiciones exactamente iguales a la adsorción previa. Sin embargo, en otros casos la adsorción es irreversible y el adsorbato se queda retenido en la superficie del adsorbente independientemente de los cambios que se produzcan en el medio en el que se encuentra (*De Santiago, 2012*).



*Figura 7. Esquema descriptivo de adsorción-desorción.*

### 2.2.2 Isoterma de adsorción

Indica la relación de equilibrio entre la concentración de adsorbato en la fase fluida y la concentración en las partículas de adsorbente a una temperatura determinada. Gráficamente representa la cantidad de soluto adsorbido (g de adsorbato/ g de adsorbente) frente a la concentración de adsorbato en la fase fluida (en mg/L o ppm para líquidos o en fracción molar o presión parcial para gases).

Son cinco los diferentes tipos de isothermas de adsorción propuestas por Brunauer, Deming, Deming & Teller, como la clasificación *BDDT* (Brunauer et al., 1940) o clasificación de Brunauer (Brunauer, 1945), posteriormente se incorporó una sexta tipología, creando la clasificación conocida como clasificación de la IUPAC (Sing et al., 1985) (De Santiago, 2012).

A continuación se detallan cada una de las isothermas (*Figura 8*) (De Santiago, 2012):

- *Isoterma tipo I*: es característica de los sólidos microporosos. Se reconoce por una subida inicial rápida debida al llenado de microporos y una larga plataforma pseudo-horizontal en la zona central de la isoterma, que refleja la ausencia de adsorción en multicapas sobre la superficie del sólido.
- *Isoterma tipo II*: es característica de sólidos macroporosos o no porosos. La pendiente ascendente de prácticamente la totalidad de la isoterma es debida a la adsorción en monocapa-multicapa sobre la superficie estable, externa del sólido, sin presencia de microporos ni mesoporos.
- *Isoterma tipo III*: ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbente es baja, en sólidos macroporosos o no porosos. Es un tipo muy poco frecuente.
- *Isoterma tipo IV*: es característica de sólidos mesoporosos. Se caracterizan por presentar un ciclo de histéresis debido a las propiedades de su red porosa.

- *Isoterma tipo V:* al igual que la isoterma tipo III, es característica de interacciones adsorbato-adsorbente débiles, pero se diferencia de la anterior en que el sólido en este caso es mesoporoso.
- *Isoterma tipo VI:* es poco frecuente. Este tipo de adsorción en escalones ocurre solo para sólidos con una superficie no porosa muy uniforme.

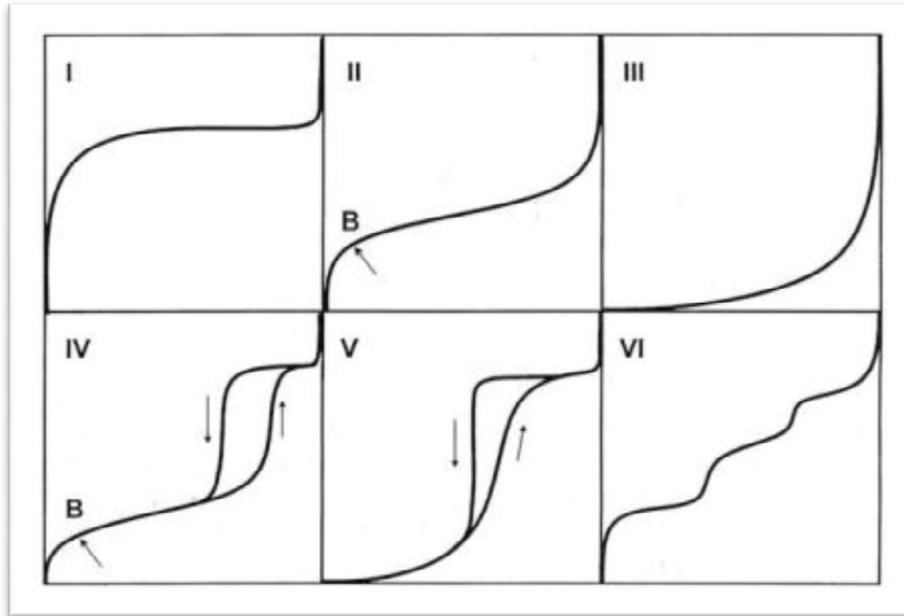


Figura 8. Clasificación de las isothermas de adsorción según la IUPAC.

En el estudio del equilibrio de adsorción se debe tener en cuenta si se trata de un sistema mono o multicomponente, es decir, en el caso de que haya más de una especie presente en la disolución hay que considerar si existe o no competencia entre ellas por el adsorbente. A continuación, se describen las isothermas de adsorción para sistemas mono componentes, que son los que competen a este trabajo (López, 2014).

Las isothermas de adsorción más conocidas y empleadas en intercambio iónico para sistemas de un solo componente son las de Langmuir, Freundlich y Factor de Separación Constante. En este caso nos vamos a centrar en la isoterma de Langmuir.

- *Isoterma de Langmuir*

En 1916, Irving Langmuir publicó una isoterma para gases adsorbidos en los sólidos, que conservó su nombre. Es una isoterma empírica derivada de un mecanismo cinético propuesto. Se basa en cuatro hipótesis (De Santiago, 2012):

- Todos los sitios del sólido tienen igual actividad para la adsorción.
- No existe interacción entre las moléculas adsorbidas.
- Cada unión adsorbato-adsorbente tiene la misma estructura y sucede por el mismo mecanismo.
- Cada sitio o poro del sólido puede albergar una sola molécula de adsorbato.

Para líquidos (adsorbato) adsorbidos en sólidos (adsorbente), la isoterma de *Langmuir* queda expresada por (López, 2014):

$$q_{ei} = \frac{K_{eq} \times q_m \times C_{e,i}}{1 + K_{eq} \times C_{e,i}} \quad \text{ó} \quad \frac{K_L i \times C_{e,i}}{1 + a_L \times C_{e,i}}$$

donde  $K_L$  es la constante de Langmuir e indica la adsorción del soluto,  $a_L$  se refiere a la energía de adsorción (L/mg) y  $C_{e,i}$  es la concentración que queda en la disolución después del proceso de adsorción una vez alcanzado el equilibrio. La capacidad máxima de saturación vendrá dada por  $q_m = K_L/a_L$ .

La forma en la que se lleva a cabo la adsorción de proteínas en este trabajo, es manteniendo el fluido que contiene el soluto o adsorbato en contacto con el adsorbente a una temperatura constante. Pasado el tiempo estimado de adsorción se mide la concentración de adsorbato disuelto en el fluido. Esta medición se hace mediante el *método de Lowry*, que se explica brevemente a continuación.

### **2.2.3 Método de Lowry**

Es un método colorimétrico que se emplea para determinar cuantitativamente la cantidad de proteínas presentes en una muestra. A dicha muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas (según la ley de Lambert-Beer) (Rivera, 2012). Este método consta de dos etapas:

1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Rivera, 2012).

El instrumento empleado es un espectrofotómetro, que se configura a 580 nm y en el que se introduce una cubeta con la muestra en su interior, y a través de la cuál pasará radiación electromagnética REM (luz) a la longitud de onda mencionada anteriormente. Permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de proteína (soluto) con una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

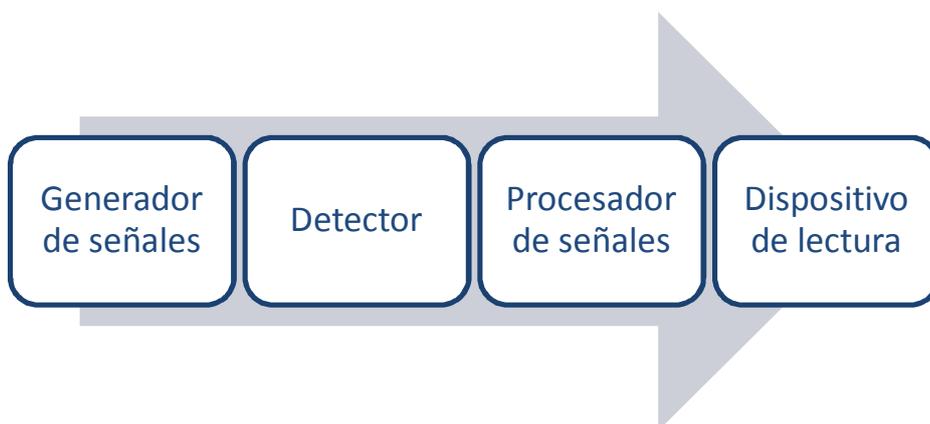
### **2.3 Instrumentos analíticos. Espectrofotómetro.**

Los instrumentos analíticos transforman la información relacionada con las propiedades físicas o químicas del analito, en información que pueda ser manipulada e interpretada por un ser humano. Para conseguir la información del analito deseada es

necesario proporcionar un estímulo, generalmente en forma de energía electromagnética, eléctrica, mecánica o nuclear. El estímulo provoca una respuesta del sistema objeto de estudio. La información resultante radica en el fenómeno que surge de la interacción del estímulo con el analito (Skoog et al., 2003).

Un ejemplo habitual y que resume lo hecho en este estudio, es el paso de una banda estrecha de longitudes de onda de luz visible a través de una muestra para medir la capacidad de absorción del analito, que en este caso es una proteína. Se determina la intensidad de luz antes y después de su interacción con la muestra y la relación entre ellas proporciona la medida de la concentración del analito (Skoog et al., 2003).

Los elementos básicos de un instrumento analítico se enumeran en la *Figura 9*:



*Figura 9. Componentes básicos de un instrumento analítico (Hernández et al., 2002)*

El *generador de señales* produce una señal directamente relacionada con la concentración del analito. En esta ocasión además, el proceso de generación de señal se complica, pues además de la señal de la propia muestra, se necesita una fuente de radiación y un monocromador (selector de longitud de onda) (Hernández et al., 2002).

El *detector*, también llamado transductor de entrada, es un dispositivo que convierte un tipo de señal en otro. Aquí se habla de un tubo fotomultiplicador que transforma la energía radiante en una corriente eléctrica. La señal procedente del detector se modifica en el *procesador de señales*, adaptándose al dispositivo de lectura. En muchas ocasiones se produce simplemente una amplificación, si bien, a menudo, simultáneamente las señales se filtran para reducir el ruido de fondo (Hernández et al., 2002).

Finalmente, el *dispositivo de lectura* transforma la señal procesada en una señal inteligible para el observador.

### 2.3.1 Curvas de calibrado

La calibración es un proceso que relaciona la señal analítica medida con la concentración del analito.

Operando con una sola muestra patrón, se tiene el inconveniente de que el resultado se pueda ver afectado por el error indeterminado propio de la medida de ese patrón. Por ello resulta más conveniente comparar con respecto a varias muestras patrón incluidas en un calibrado. Estos calibrados minimizan el efecto de los errores indeterminados propios de la medida con un patrón único (Hernández et al., 2002).

Para realizar el método de la curva de calibrado, se introducen en el instrumento varios patrones que contienen concentraciones exactamente conocidas de analito y se registra la señal instrumental. Normalmente esta señal se corrige con la correspondiente señal obtenida con el blanco. En condiciones ideales en blanco contiene todos los componentes de la muestra original excepto el analito. Los datos obtenidos se representan para obtener una gráfica de la señal corregida del instrumento frente a la concentración de analito (Skoog et al., 2003).

La *Figura 10* muestra una curva de calibrado característica (también denominada curva patrón o curva analítica). A menudo se obtienen representaciones gráficas que son lineales, lo cual es deseable, ya que están menos sujetas a error que las curvas no lineales. Sin embargo no es raro encontrar representaciones gráficas no lineales. Se obtiene la ecuación de la curva de calibrado por el método de mínimos cuadrados, que permite calcular directamente la concentración de las muestras (Skoog et al., 2003).

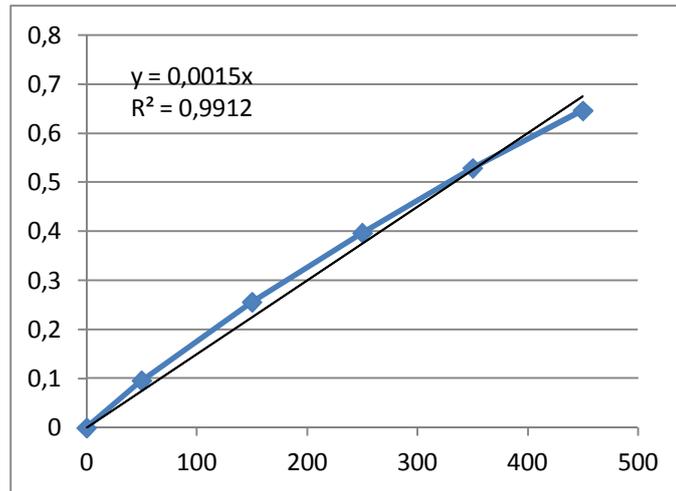


Figura 10: Representación gráfica de la recta de calibrado en un método de retención de proteínas.

Lo más habitual como se ha comentado antes, es que la gráfica se aproxime a una línea recta. Obsérvese sin embargo, que no todos los datos quedan exactamente sobre dicha línea debido a los errores aleatorios del proceso de medida. Por tanto se debe intentar ajustar la “mejor” línea recta que pase a través de los puntos, y la forma más habitual es utilizar el *método de mínimos cuadrados* (Skoog et al., 2003).

Al aplicar el método de mínimos cuadrados, se supone que la línea recta es un buen modelo para relacionar el área de los picos (y) y la concentración del analito (x) que viene dada por la ecuación:

$$y = mx + b$$

en la que  $m$  es la pendiente de la línea recta y  $b$  la ordenada en el origen.

## 2.4 Transglutaminasa

La enzima *transglutaminasa* posee una serie de propiedades tecnológicas de gran interés para la industria alimentaria ya que permite desarrollar nuevos alimentos de alto valor añadido de base proteica, como son los productos reestructurados, sin necesidad de aplicar tratamiento térmico. Entre las aplicaciones principales se encuentra su uso como agente texturizante, espesante y gelificante de alta estabilidad y con capacidad de reestructuración en frío (Ríos, 2010).

Pertenece a una familia de enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la reacción de formación de un enlace covalente entre un grupo amino (por ejemplo la cadena lateral de una lisina -Lys-) y un grupo carboxiamida (un ejemplo sería la cadena lateral de un residuo de glutamina -Gln-). Se trata de enzimas que inducen a la polimerización de las proteínas (a diferencia de la mayoría de enzimas industriales –amilasas, lipasas y proteasas– que catalizan reacciones de hidrólisis). En consecuencia, son capaces de modificar las propiedades funcionales y de textura de las proteínas creando productos con mayor consistencia y de mejor calidad (Ríos, 2010).

La reacción catalizada por la transglutaminasa es controlada por la relación tiempo/temperatura aunque la unión proteica ocurre independientemente del calentamiento, congelación o adición de sal o fosfatos. La transglutaminasa se puede inactivar por elevación de la temperatura (2 h a 65°C, 15 min a 70°C, 5 min a 75°C, 1 min 80°C) y en presencia de agentes que modifiquen los grupos SH (absorbedor de oxígeno) pues es muy sensible a la oxidación. A temperaturas de congelación se produce una detención de la actividad enzimática y es estable (cerca de 100% de actividad) en un amplio rango de pH (5-8), lo que permite su aplicación en una gran cantidad de productos alimenticios. Habitualmente se consideran buenos sustratos las proteínas con estructuras aleatorias, como la caseína y la gelatina, y las que contienen muchos residuos de lisina y glutamina, como la proteína de soja y de trigo (Ríos, 2010).

Existen dos tipos de TG, las calcio dependientes, las cuales se encuentran en hígado y plasma de mamíferos, en pescados y plantas; y las calcio independientes (TGm), producidas por la fermentación de algunos microorganismos como *Streptoverticillum cinnamoneum* y *Streptoverticillum mobaraense*. Estas últimas son las más utilizadas comercialmente (Márquez et al., 2006).

### ***3 MATERIAL Y MÉTODOS***

### 3.1 Separación de la membrana de la cáscara de huevo

En este proyecto, los huevos empleados para la obtención de dichas membranas fueron los de tipo A de tamaño mediano, de la marca *Alimerka*.

La separación de la membrana de la cáscara fue totalmente manual. Tras la ruptura del huevo y la separación de la yema y la clara, se retiró la membrana que se encuentra pegada a la cáscara con ayuda de una pinza. Es importante evitar que restos de yema y clara queden adheridos a las membranas. Si bien el tamaño de los trozos de membrana conseguidos no han sido importantes a la hora de valorar los resultados obtenidos, el hecho de que sean lo más grandes posibles facilita el trabajo en etapas posteriores.

El número de huevos empleados fue muy elevado. El motivo se reduce a que la membrana es un material muy escaso dentro de la estructura del huevo, de hecho representa el 0.7 % del peso total, por lo que se hizo necesario utilizar muchas docenas de huevos para alcanzar cantidades significativas de membrana con las que poder trabajar.

### 3.2 Tratamientos de la membrana

Una vez que las membranas fueron separadas de la cáscara, necesitaron ser lavadas y conservadas, pues su empleo en diferentes ensayos hacía necesario su almacenamiento (en refrigeración a unos 4°C).

Se llevaron a cabo, por tanto, dos tipos de tratamientos diferentes, con el fin de trabajar con dos materiales distintos para su estudio en diferentes aplicaciones. Además de estos dos tratamientos, también se ha trabajado con la membrana nativa sin tratar, es decir, aquella a la que no se le ha aplicado ningún tipo de procedimiento.

### **3.2.1 Membrana sin tratamiento (MST)**

En este caso a la membrana solo se le realizaron cinco lavados con agua destilada para eliminar los posibles restos de yema, clara y cáscara que pudieran quedar adheridos en el proceso de pelado de la membrana. Posteriormente fue congelada y liofilizada.

### **3.2.2 Membrana sometida a tratamiento A (MTA)**

Se trata de un tratamiento con ácido clorhídrico y sosa caústica adaptado del método [Ishikawa et al., \(2001\)](#).

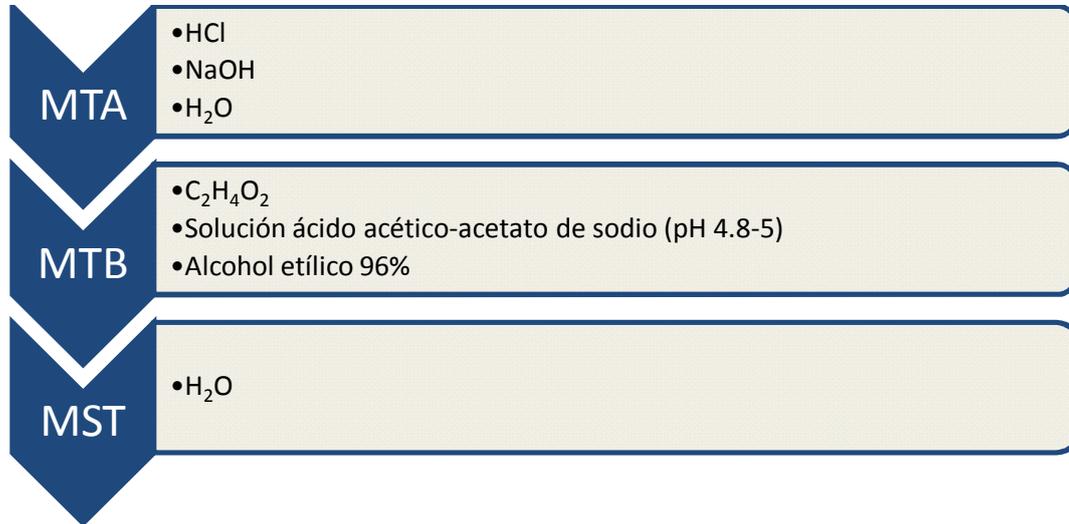
Se sumergieron las membranas en 0.5 L de ácido clorhídrico a 0.5 M durante toda la noche, después y tras retirar el ácido filtrando con la ayuda de un embudo de cerámica (para evitar pérdida de material), se sumergieron las membranas en 0.5 L de NaOH a 0.1 M y se dejaron durante una hora. A continuación se lavaron las membranas con agua destilada un total de diez veces, para eliminar completamente los restos de ácido o sosa que pudieran quedar.

### **3.2.3 Membrana sometida a tratamiento B (MTB)**

Este tratamiento se adaptó del método descrito por [Liao et al., \(2004\)](#).

La membrana pelada, fue tratada inicialmente con una solución de ácido acético con una concentración de 16.0 g/L, con la que se lavó un total de tres veces para eliminar las sustancias minerales. En cada uno de los lavados, las membranas se mantuvieron sumergidas quince minutos en la solución de ácido acético. Posteriormente se lavaron las membranas con un tampón de ácido acético-acetato de sodio (25 g/L) que se mantuvo durante treinta minutos en contacto con las membranas para conseguir un pH de 4.8-5.0. A continuación la membrana fue deshidratada, empleando para ello alcohol etílico al 96% con el que se lavó la muestra un total de tres veces. Finalmente fueron secadas al vacío en el liofilizador durante toda la noche (sin proceso de congelación previo).

En la *Figura 11*, se resumen los diferentes tratamientos que se les aplicaron a las membranas de la cáscara de huevo.



*Figura 11. Esquema resumen de los diferentes tratamientos aplicados a las membranas de la cáscara de huevo.*

### 3.3 Liofilización

Sea cual sea el tratamiento elegido, el paso siguiente es congelar las membranas tratadas a -80°C para posteriormente someterlas a liofilización (*Figura 12*) (a excepción del tratamiento B, que se liofiliza directamente sin falta de congelar antes). Para llevar a cabo este proceso se utilizó un liofilizador *TELSTAR modelo Cryodos* (-70°C / 0.1 mBa). Una vez liofilizadas se conservaron en refrigeración, en torno a los 4°C.



*Figura 12. Membrana dispuesta a ser liofilizada.*

Para su empleo en los diferentes ensayos que se realizaron a continuación, se tamizaron las membranas liofilizadas con un tamiz con tamaño de luz de 0.5 mm. Al final, y fuera cual fuera el tratamiento aplicado, se obtenían dos tipos de materiales con los que trabajar, por un lado la membrana en polvo con un tamaño de partícula de 0.5 mm (MP) y por otro lado el resto del material que no se había conseguido tamizar y que por lo tanto era más grueso (MG), pues también fue de utilidad para según qué experimentos.

### **3.4 Caracterización de la membrana**

Para conocer bien con qué tipo de material se estaba trabajando, y sabiendo además que la membrana de la cáscara de huevo es un material poco estudiado, se hizo indispensable su estudio y caracterización, para ello se han llevado a cabo los siguientes ensayos.

#### **3.4.1 Observación al microscopio electrónico de barrido (SEM)**

Con la intención de conocer y estudiar la capa superficial de las membranas de las cáscaras de huevo, se observó al microscopio electrónico de barrido tanto la muestra en polvo (tamizada) como la gruesa (no tamizada), de los dos tipos de membrana sometidas a tratamiento, MTA y MTB.

Se realizaron microfotografías de los materiales con el microscopio electrónico *Jeol 6610*. La muestra se colocó en unas setas con cinta adhesiva conductora de doble cara y se revistió con una película delgada de oro utilizando un equipo *Balzers SCD 004* por un método conocido como “sputtering” o por evaporación al vacío (López, 2014).

### **3.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Con el fin de averiguar cómo se comporta la membrana en términos de masa con un incremento lineal de la temperatura a lo largo del tiempo, se sometió a un análisis termogravimétrico en condiciones de atmósfera controlada en un equipo de análisis térmico diferencial *TGA/SDTA851e*. Para ello se llevó a analizar una muestra de la MPTA (tamizada).

### **3.4.3 Porosimetría de intrusión de mercurio**

Las medidas realizadas en el presente trabajo se efectuaron con el porosímetro *Micromeritics Autopore IV*, (Figura 13). Se midió la muestra MTA (López, 2014).



*Figura 13. Porosímetro de intrusión de mercurio*

### 3.4.4 Adsorción-desorción de nitrógeno

Las membranas MTA y MTB fueron previamente desgasificadas en vacío a 50 °C. Las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77 K se obtuvieron utilizando la técnica volumétrica con el equipo *Micromeritics ASAP 2020* (Figura 14) (López, 2014).

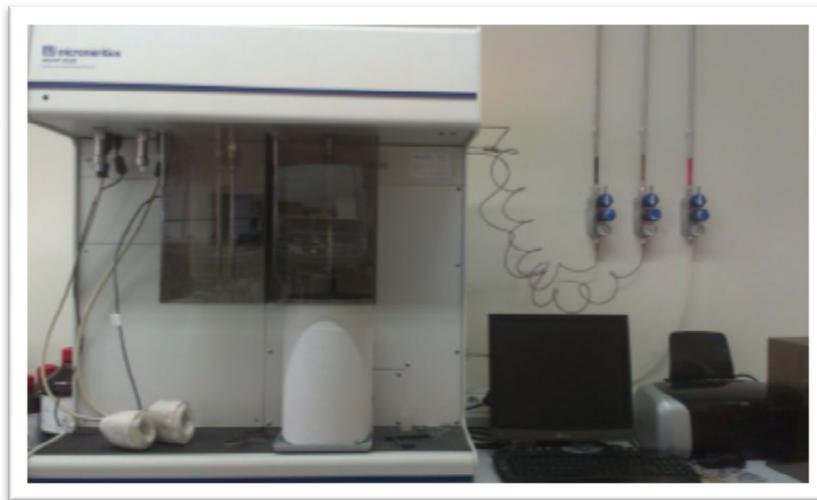


Figura 14. Porosímetro de intrusión de mercurio

### 3.4.5 Determinación de proteínas: Método Kjeldahl.

El método Kjeldahl se utiliza en química analítica para la determinación del contenido de nitrógeno en muestras orgánicas, lo que es de gran interés en el ámbito alimentario. Se trata de un método ampliamente utilizado y consiste en la determinación de nitrógeno orgánico. El objetivo por lo tanto es determinar la concentración de nitrógeno presente en la muestra para luego ser transformado en proteína a través de un factor empírico, que para el caso de los huevos es de 6.25 (Merril y Watt, 1973).

Este análisis se realizó tanto a MST como a MTA para averiguar así si el tratamiento afecta o no a la proteína que compone la membrana, que en su mayoría corresponde a colágeno. El procedimiento seguido en ambos casos fue el mismo.

El método Kjeldahl se puede dividir en dos fases:

- **Fase de digestión y neutralización**

El análisis se hizo por triplicado, empleándose en cada una de las réplicas en torno a 0.4 g de membrana no tamizada. Se necesitaron también tres blancos, para los que se utilizó 1 mL de agua destilada para cada uno de ellos.

A todos ellos (blancos y muestras) se le añadió ácido sulfúrico al 96%, acompañado de un catalizador comercial, que en este caso fue 1.5 % Cu-Se, 5H<sub>2</sub>O + 2% Se. Una vez realizado todo esto, se inició la digestión en un digestor *Tecator digestor (Foss)* a una temperatura de ~ 420°C durante treinta minutos con la ayuda del manto calefactor.

Lo que aquí se consigue es que el nitrógeno orgánico total se convierta en sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

- **Fase de neutralización, destilación y titulación**

El material obtenido en la anterior fase, se neutralizó con una base y se destiló en el destilador *marca Foss, modelo Kjeltex 2200*. El destilado se recogió en una solución de ácido bórico, donde se formaron aniones de borato (proporcional a la cantidad de nitrógeno), que al ser valorados con HCl 0.1 N permitió determinar el nitrógeno contenido en la muestra. Según el volumen gastado en el viraje de color se puede calcular la cantidad de nitrógeno, y por lo tanto de proteína al aplicar el factor de conversión.

Los cálculos llevados a cabo fueron los siguientes:

$$\% N = \frac{(T - B) \times N \times 14.007 \times 100}{\text{Peso muestra (mg)}}$$

$$\% \text{ Proteina} = N \times F$$

Dónde:

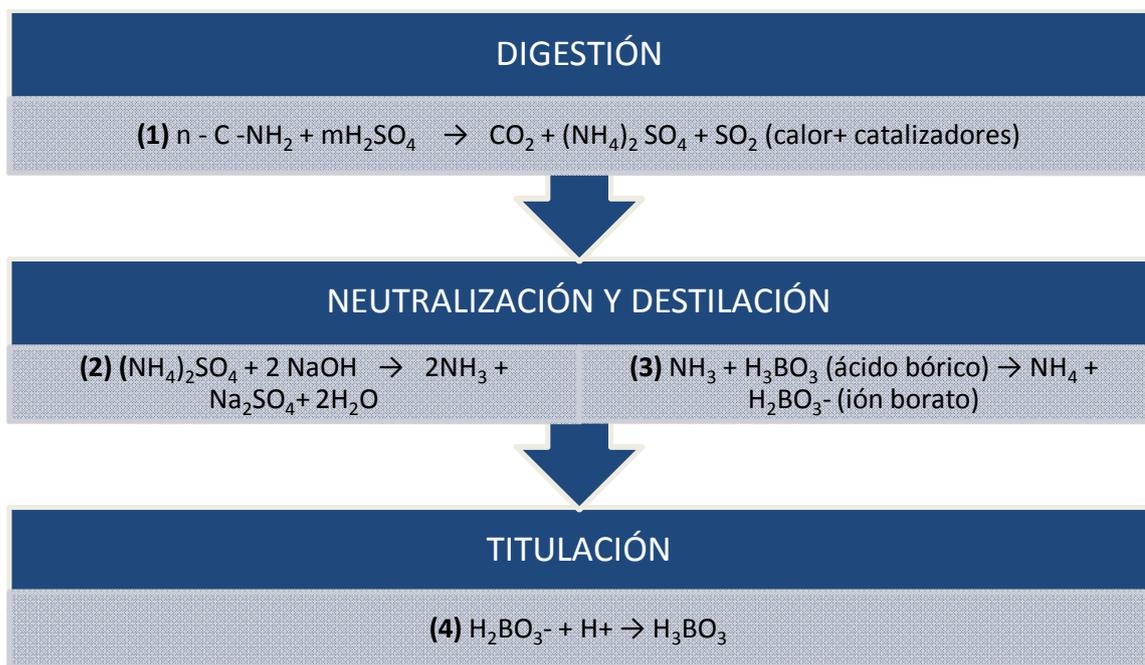
T = volumen empleado en la titulación de la muestra.

B= volumen empleado en la titulación del blanco.

N = Normalidad del ácido clorhídrico (0.1 N)

F = Factor de conversión (6.25 para alimentos)

En la *Figura 15*, se esquematiza los pasos en los que se divide el método Kjeldahl para la determinación de proteína en las membranas de las cáscaras de huevo.



*Figura 15. Esquema resumen de las diferentes fases en las que se divide el método Kjeldahl.*

### 3.5 Ensayos experimentales

#### 3.5.1 Capacidad de retención de proteínas

Para este análisis se emplearon tanto las membranas sometidas a tratamiento A (MTA) como las sometidas al tratamiento B (MTB), y para cada una de ellas el procedimiento fue diferente.

- **Retención de proteínas por MTA**

Para llevar a cabo este ensayo se empleó la fracción V de la proteína seroalbúmina bovina al 96% de pureza (BSA, pI=4.9) (*Sigma-Aldrich*.)

Se utilizó una disolución proteica con una concentración de 1g BSA /L, que además tenía que estar a un pH de 5.5. Para ajustarlo se empleó ácido clorhídrico 0.5M. El siguiente paso consistió en poner en contacto dicha disolución de proteína a pH 5.5 con la MTA, y mantenerla en agitación a 150 rpm y a 25°C durante 2 horas en el *agitador-incubador New Brunswick scientific, modelo Excella E24*. Para ello se sumergieron 0.1 g de MTA en 25 ml de disolución de BSA (relación líquido/sólido de 250), (adaptado de [Li et al., 2013](#)).

En esta fase se hicieron dos pruebas, una con la membrana en polvo (MPTA), y otra con la membrana no tamizada (más gruesa, MGTA), de manera que se trabajó por duplicado, pues se empleó la misma muestra pero con dos tamaños de partícula distintas. De esta manera se pudo observar si el tamaño de la membrana influye en su capacidad de retener proteínas.

Pasado el tiempo mencionado, y tomando como valor inicial la concentración de proteína en la disolución de 1g BSA/ L, se midió la concentración de proteína que existía en ambos casos, de manera que se descubrió por comparación con el valor inicial, si alguno de los dos tipos de membrana retenía o no proteína.

Se observó que pasado el tiempo de agitación, el sobrenadante no estaba limpio, partículas de membrana se encontraban en suspensión, algo que podría interferir en los resultados de la prueba, así que antes de hacer las mediciones correspondientes, se centrifugaron ambas muestras en la centrifuga *5415 R*, durante cinco minutos a 11.000 rpm, rescatando entonces el sobrenadante limpio sobre el que se trabajó para averiguar la cantidad de proteína adsorbida.

Una vez que las muestras ya estaban preparadas, el siguiente paso fue la medición de la cantidad de proteína presente en ese sobrenadante. Esto se realizó aplicando el método de *Lowry*.

- **Retención de proteínas por MTB**

Preparación de la fibra adsorbente de colágeno

Supone una adaptación del método [Li et al, 2013](#).

El primer paso que se realizó, fue preparar al colágeno que compone la membrana para que fuera capaz de adsorber proteínas. Para ello se empezó por hidratar las membranas, así que se dejaron a remojo en agua destilada durante 24 horas en una proporción 15/300 (g/mL).

A continuación, se le añadieron 0.75 g de glutaraldehído al 50% (*Sigma-Aldrich*) y se mantuvo en agitación durante un periodo de dos horas a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se ajustó el pH a 7 con una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  (15% w/w). Una vez conseguido el pH deseado, se mantuvo en agitación en las mismas condiciones que antes, pero esta vez durante cuatro horas.

Pasado este tiempo se lavó tres veces consecutivas con agua destilada, secando la muestra en cada una de las ocasiones con ayuda de un matraz *kitasato* conectado a una bomba de vacío (*Figura 16*). Después se midió el pH final para comprobar que estaba dentro de los parámetros y se llevó a congelar a  $-80^\circ\text{C}$ , para posteriormente liofilizar.



*Figura 16. Matraz kitasato conectado a la bomba de vacío.*

Tras este proceso, ya se pudo llevar a cabo el ensayo de adsorción de proteínas propiamente dicho.

### Retención de proteína

Una vez preparado el colágeno, los pasos a seguir fueron los mismos que en el caso de la MTA, solo que en esta ocasión se trabajó además de con la BSA, con la proteína ovoalbúmina (OVA, pI= 4.5-5) (*Sigma-Aldrich*).

Se prepararon disoluciones de BSA u OVA al pH requerido (con ayuda de HCl al 20% y NaOH 0.1 N), con una concentración de 0.5 mg BSA/mL de disolución. Una vez se tuvieron las disoluciones de BSA/OVA, se utilizó una relación líquido/sólido de 250 (2.5mL disolución/0.01g de MTB) que se mantuvo en agitación en un *agitador-incubador New Brunswick scientific, modelo Excella E24* (Figura 17), a 150 rpm y a 25°C durante más de doce horas.



Figura 17. Agitador-incubador New Brunswick scientific, modelo Excella E24

Pasado este tiempo, se centrifugaron en una centrífuga *modelo 6500 Kubota*, a 8000 rpm durante diez minutos y a 20°C. El sobrenadante limpio obtenido se empleó para la medición de proteína con el método de *Lowry* empleando un espectrofotómetro *Thermo scientific, modelo Helios Y*.

- **Método de Lowry**

Reactivos

- Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y NaOH 0,1 M.
- Reactivo B1:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%.
- Reactivo B2: tartrato sódico-potásico al 2%.
- Reactivo C: Se prepara, mezclando los reactivos: A, B1 y B2, en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen).
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido a 1/2. Se prepara en el momento y debe utilizarse en el día.
- Solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (1 g/L).
- Muestra problema (diluida 1/2).

Procedimiento

En primer lugar, para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se construyó una *curva patrón o de calibrado* a partir de una solución patrón (BSA) (1g/L). La concentración que tenían las muestras problema se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. El *blanco*, que sólo contiene agua destilada y los reactivos, sirvió para el ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia.

Para establecer esta recta de calibrado, se midió la absorbancia en cinco puntos de concentración conocida: 50, 150, 250, 350 y 450 ppm. Todos estos puntos, así como el blanco se realizaron por triplicado. Las cantidades de agua y disolución patrón de seroalbúmina empleadas para la elaboración de la recta patrón, están indicadas en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Proporciones de agua y patrón (BSA) que son necesarios para la generación de la recta patrón.

CLASE	AGUA (ml)	PATRÓN BSA (ml)
Blanco	1 ml	-
50 ppm	0.9	0.1
150 ppm	0.7	0.3
250 ppm	0.5	0.5
350 ppm	0.3	0.7
450 ppm	0.1	0.9

La *muestra problema*, se diluyó en una proporción 1:2 para mantener la muestra dentro del rango de medida del espectrofotómetro (no superior a 500 ppm), de manera que se añadieron 0.5 ml de muestra y 0.5 ml de agua destilada. Se prepararon las muestras por triplicado.

El *reactivo C* y el *reactivo Folin-ciocalteau* han de ser preparados en el momento de su uso y en condiciones de oscuridad, pues la reacción que se genera es fotosensible. El reactivo C se preparó mezclando A, B1 y B2 en una proporción de 50: 0.5: 0.5. El reactivo *Folin-ciocalteau* se diluyó  $\frac{1}{2}$ , así que en función de las muestras para analizar que se tengan, se preparará un volumen u otro de reactivo C y de reactivo *Folin-ciocalteau*, pero siempre respetando las proporciones indicadas anteriormente.

Una vez ya estuvieron todos los reactivos listos para su empleo, se añadieron a los blancos, recta patrón y muestras, 5mL de reactivo C, tras lo cual hubo que esperar quince minutos a oscuras. Pasado este tiempo, se añadieron 0.3 mL de reactivo Folin y se esperó de nuevo en oscuridad treinta minutos.

Tras haber esperado el tiempo necesario en condiciones de oscuridad a que se llevara a cabo la reacción, se procedió a la medición de la absorbancia de cada uno de los tubos en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 580 nm y ajustando previamente el aparato a absorbancia cero con el blanco; de esa forma sólo se mide el color producido por las proteínas, puesto que se resta el color generado por los reactivos. Dependiendo

de la intensidad de color generada con la reacción (proporcional a la creación de complejos proteína-reactivo), se obtendrá una absorbancia que indica cuantitativamente la cantidad de proteína contenida en la muestra.

### **3.5.2 Capacidad de desorción de proteínas**

Para este análisis se emplean las MPTB tratadas con diferentes concentraciones de proteína OVA (50,100, 200 y 300 ppm), que han sido utilizadas en los ensayos de retención de proteínas, y que tienen OVA adsorbida a su superficie. La intención es averiguar si estas membranas son capaces de desorber dicha proteína.

#### Procedimiento

Las MPTB estaban almacenadas en congelación (-18°C). Una vez que fueron descongeladas, se les retiró el exceso de líquido con el que se las había guardado con ayuda de una bomba de vacío y se les añadió agua destilada en una relación líquido/sólido de 10:1, para posteriormente dejarlas en agitación durante treinta minutos (150 rpm a 25°C). Pasado este tiempo se cogió muestra para analizar la cantidad de proteína desorbida por el método de Lowry.

Tras esto, se les volvió a eliminar el exceso de agua con ayuda de la bomba de vacío, y en esta ocasión se les añadió NaOH 0.25 M en una relación líquido/sólido de 20:1. A continuación se pusieron a agitar en las mismas condiciones durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se sacó muestra para de nuevo medir con el método de Lowry la cantidad de proteína liberada. Esto mismo se repitió posteriormente pero empleando en esta ocasión NaOH 1 M.

### **3.6 Retención de cobre**

Para este ensayo solo se empleó MTA, pues se llevó a cabo una adaptación de [Ishikawa et al., \(2001\)](#).

### Procedimiento

Se necesitaba una disolución de cobre con una concentración de 100 ppm, para ello se utilizó Cobre II cloruro 2-hidrato ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A 50 ml de esta disolución de cobre se le añadieron 0.05 g de membrana en polvo (relación líquido/sólido de 1000) y se dejó en agitación durante 2 horas a 150 rpm y a 25°C.

Se tomó una muestra de la disolución de cobre inicial y de la disolución con la membrana pasadas las 2 horas de agitación y se llevó a medir la cantidad de cobre mediante la técnica *ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)*, que calcula la cantidad de cobre adsorbido por la membrana al compararlo con el cobre existente en la muestra de la disolución inicial. El cobre fue cuantificado empleando un espectrofotómetro de masas *HP 7500c (Agilent Technologies)*.

## **3.7 Formación de geles**

### **3.7.1 Transglutaminasa**

Para estudiar la capacidad de la membrana de la cáscara de huevo para generar geles, se empleó la enzima *transglutaminasa*. Debido a las propiedades del material empleado, se decidió trabajar de la siguiente manera (adaptación de [Tang et al., 2013](#) y [Zhong et al., 2012](#)).

### Procedimiento

La muestra tamizada se diluyó en una proporción 1:10, de manera que se emplearon 0.15 gramos de la membrana en polvo en 1.5 mL de agua destilada. En este punto se encontró con la dificultad de que la membrana es muy poco densa, por lo que los 1.5 mL de agua no fueron suficientes para empapar toda la muestra, así que se decidió trabajar con un volumen de agua superior, 3.5 mL, cambiando por lo tanto la relación líquido/sólido.

Esta solución de proteína se mezcló con 0.3 g de la enzima transglutaminasa, tras lo cual se dejó a 50°C durante 1.5 horas. Pasado este tiempo, se observaron los resultados.

### 3.7.2 Ácido oleico

Anteriormente, se intentó crear geles mediante la utilización de la enzima transglutaminasa. Esta vez, se intentó con otro componente distinto, el ácido oleico (Abu Diak et al., 2007).

#### Reactivos:

- MPTA y MPST
- Amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)
- Agua destilada
- Ácido oleico (C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>)

Al igual que con la mencionada enzima, se comenzó empleando unas cantidades, pero se fueron modificando en ensayos sucesivos con la intención de obtener mejores resultados. Las cantidades empleadas se indican la *Tabla 2*.

*Tabla 2. Resumen esquemático de los diferentes ensayos llevados a cabo.*

ENSAYO	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD MUESTRA (g)	AMONIO (g)	AGUA DESTILADA(g)	ÁCIDO OLEICO (μl)
I	MPTA	0.206	0.526	22.286	400
II	MGTA	0.205	0.517	10.038	400
III	MGTA	0.205	0.525	10.007	800
IV	MGTA	0.207	0.582	10.085	600
V	MPTA	0.205	0.555	10.016	800
VI	MPTA	0.203	0.583	10.051	600
VII	MPST	0.104	0.269	5.016	400

### Procedimiento

En un vaso se añadió primero la membrana, seguida del agua y del amonio. Tras la adición del amonio se agitó todo durante cinco minutos a temperatura ambiente. En agitación se añadió el ácido oleico y se dejó otros diez minutos agitando. Tras completar la mezcla, una cantidad se dejó a temperatura ambiente y otra se llevó a 100°C aproximadamente durante unas 2 horas.

Pasado este tiempo, se observaron los resultados.

#### **3.7.3 Almidón y glicerol**

Adaptación del método [Gallegos et al., \(2013\)](#).

Se emplearon 0.05 gramos de MSTP, y se mezclaron con un 30% de almidón y un 37.5% de glicerol. Posteriormente se añadió tanta agua como fue suficiente para poder poner la mezcla en agitación durante diez minutos. Pasado este tiempo se autoclavó durante cinco minutos a 105°C y a aproximadamente 2 bar de presión en el autoclave *modelo AES-75 marca Trade Raypa*.

#### **3.7.4 Gelatina**

Adaptación de [Chambi et al., \(2006\)](#).

Se emplearon 0.5 gramos de MPST (tamizada), a la que se le añadieron 1.5 gramos de agua destilada. Esta mezcla se le ajustó el pH a 6.7 con la ayuda de NaOH 0.1N, todo ello a temperatura ambiente. Posteriormente se agitó durante treinta minutos también a temperatura ambiente, para luego dejarlo en un baño a 85 °C durante quince minutos.

Por otra parte se mezclaron 0.72 gramos de gelatina con 10.21 gramos de agua destilada, y se mantuvo en agitación durante treinta minutos a unos 55°C.

Finalmente se empleó una proporción 75:25 proteína/gelatina y se ajustó a un pH de 7.2 con la ayuda de NaOH 0.1N. Se añadieron 25g / 100g de proteína de glicerol y se incubó todo a 50°C en agitación durante quince minutos. Por último se distribuyó en placas y se dejó a temperatura ambiente toda la noche.

## ***4 RESULTADOS***

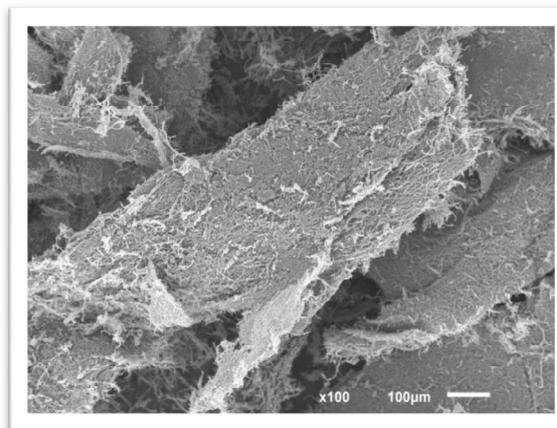
---

## 4.1 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

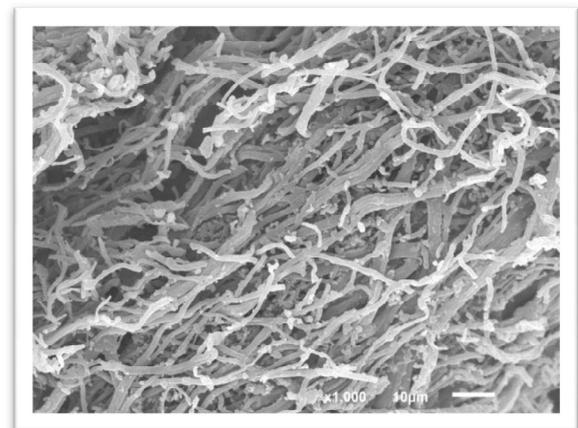
Con intención de conocer en detalle la superficie de la membrana de la cáscara de huevo, se llevaron muestras sometidas tanto a tratamiento A (MTA) como a tratamiento B (MTB) al microscopio electrónico de barrido, donde se hicieron, tras ser cubiertas por una fina capa de oro, microfotografías de las zonas más interesantes que pudieran aportar información y mostrar diferencias y similitudes entre ambos tipos de muestras.

### 4.1.1 Tratamiento A

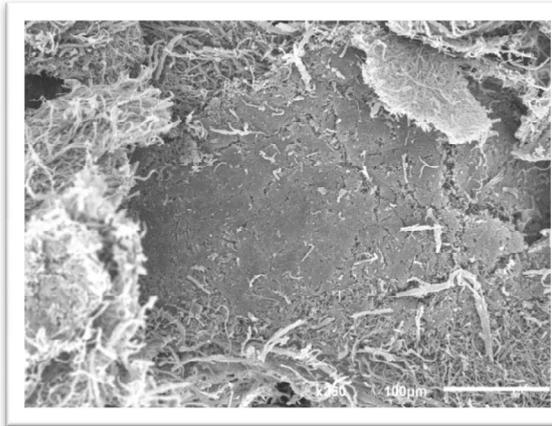
Para el caso de MTA, se analizaron al SEM tanto la muestra tamizada como la no tamizada, para de esta manera averiguar si el proceso de tamizado altera de alguna manera la superficie de la muestra. Las imágenes obtenidas de la MTA son las siguientes:



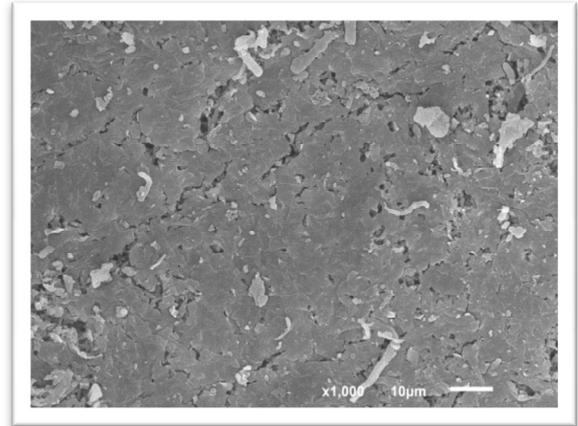
*Figura 18. MPTA al microscopio electrónico de barrido. Aumento a 100x (escala: 100 μm).*



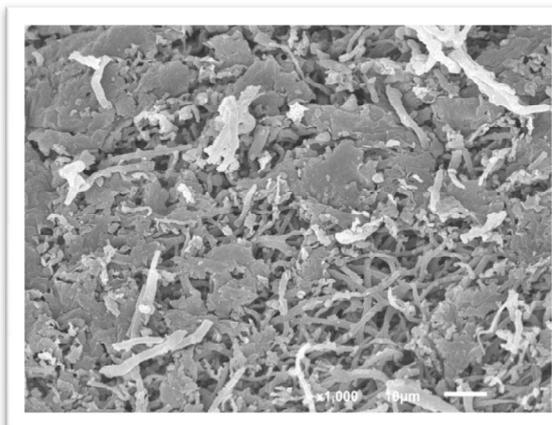
*Figura 19. MPTA al microscopio electrónico de barrido. Aumento 1000x (escala: 10 μm).*



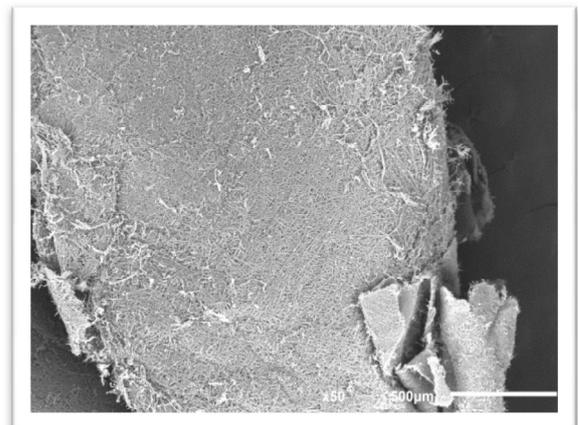
*Figura 20. Detalle de una zona visiblemente más compacta de la MPTA. Aumento 250x (escala: 100 μm).*



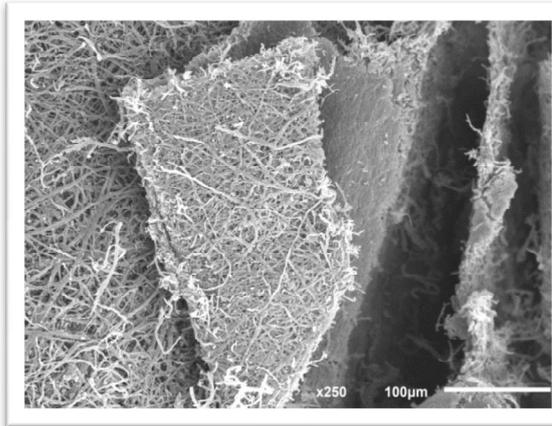
*Figura 21. Detalle de una zona visiblemente más compacta de la MPTA. Aumento 1000x (escala: 10 μm).*



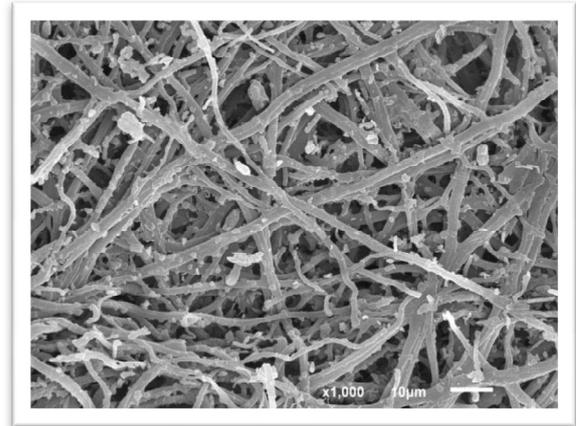
*Figura 22. Detalle de una zona con mezcla de parte fibrosa y parte más compacta de MPTA. Aumento 1000x (escala: 10 μm).*



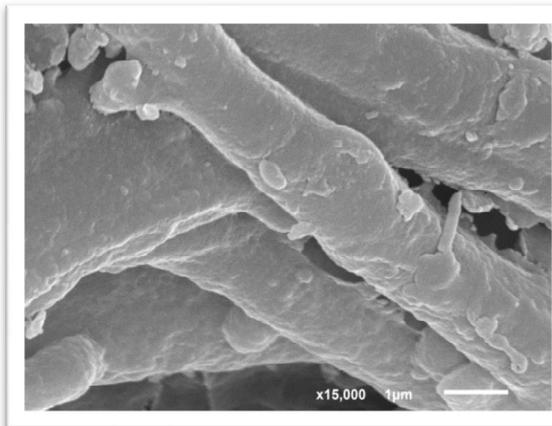
*Figura 23. MGTA al microscopio electrónico de barrido. Aumento 50x (escala: 500 μm).*



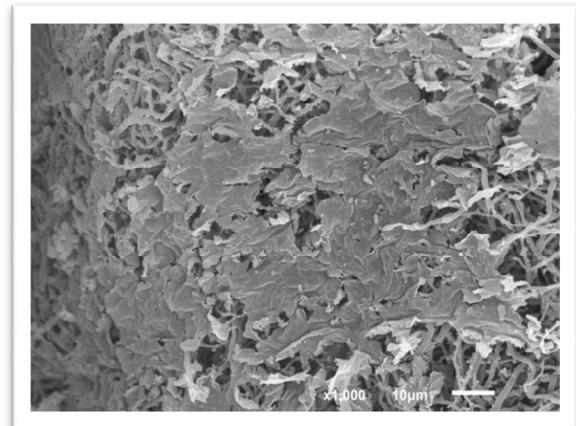
*Figura 24. Detalle de una zona de MGTA donde se ve zona tamizada (fibrosa) y zona no tamizada (lisa). Aumento 250x (escala: 100 μm).*



*Figura 25. Detalle de zona fibrosa de MGTA. Aumento 1000x (escala: 10 μm).*



*Figura 26. Detalle de las fibras que componen la MTA. Aumento 15000x (escala: 1 μm).*



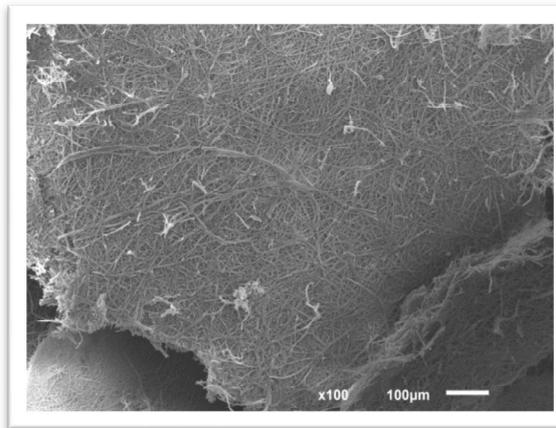
*Figura 27. Detalle de una zona con mezcla de parte fibrosa y parte más compacta de MGTA. Aumento 1000x (escala: 10 μm).*

Se observa que no existen diferencias de morfología entre la MPTA (tamizada) y la MGTA (no tamizada), ambas presentan un predominio de una estructura fibrosa (*Figuras 19, 25 y 26*), que en pequeños lugares presentan zonas más compactas, donde las fibras parecen estar cubiertas por una capa relativamente homogénea (*Figuras 21, 22 y 27*). Lo único que las distingue es la zona lisa que se aprecia en MGTA, que corresponde posiblemente con zonas no erosionadas por el tamiz (*Figura 23 y 24*).

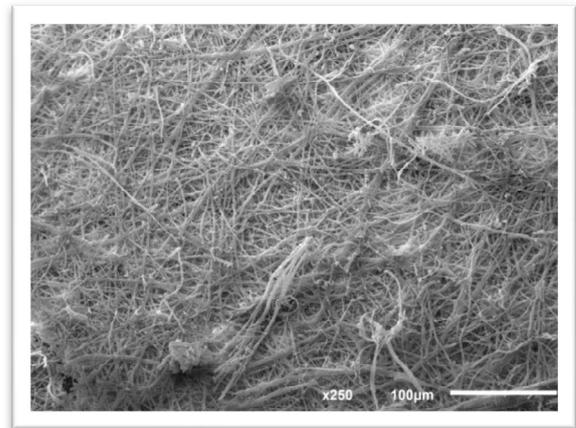
#### 4.1.2 Tratamiento B

Al igual que se hizo con las membranas sometidas al tratamiento A, las sometidas al tratamiento B también fueron analizadas al SEM. En esta ocasión, solo se examinó la MPTB, pues los resultados con la MTA muestran como la estructura de la superficie es prácticamente la misma independientemente del tamaño de partícula.

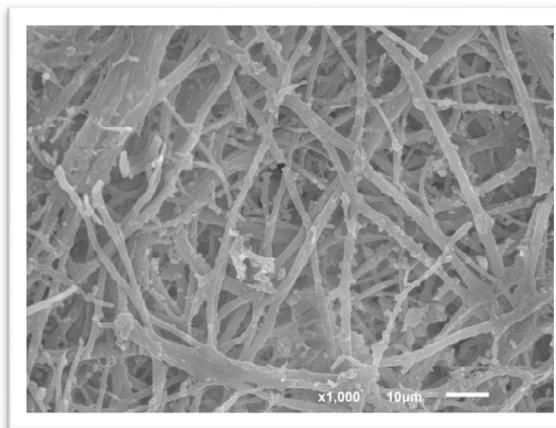
Las imágenes obtenidas con este análisis se muestran a continuación:



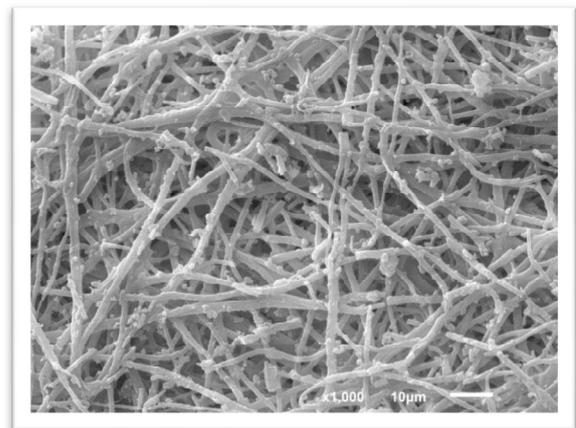
*Figura 28. MPTB al microscopio electrónico de barrido. Aumento 100x (escala: 100  $\mu\text{m}$ )*



*Figura 29. MPTB al microscopio electrónico de barrido. Aumento 250x (escala: 100  $\mu\text{m}$ ).*



*Figura 30. Detalle de las fibras que componen MPTB. Aumento 1000x (escala 10  $\mu\text{m}$ ).*



*Figura 31. Detalle de las fibras que componen MPTB. Aumento 1000x (escala: 10  $\mu\text{m}$ ).*

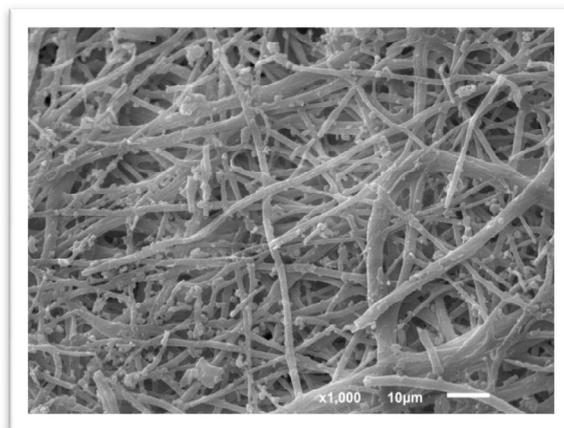


Figura 32. Detalle de las fibras que componen MPTB. Aumento 1000x (escala: 10  $\mu\text{m}$ ).

Tras la observación de estas imágenes obtenidas en el SEM, se pudo determinar que la estructura de ambos tipos de membranas, aunque muy parecidas tienen ciertas diferencias. En el caso de la membrana sometida a tratamiento A (MTA), se observa una estructura fibrosa predominante, aunque en algunas zonas es apreciable la aparición de estructuras más compactas (Figura 20). Al observar dicha estructura más compacta con un aumento aún mayor, 1000x, se puede observar en detalle la red formada por las fibras y por lo que parece una capa más homogénea (Figuras 21, 22 y 27). En el caso la membrana sometida a tratamiento B (MTB), se observa de nuevo un material muy fibroso, pero esta vez sin ninguna zona compacta (Figura 28). Se pueden observar con detalle que no existe esta capa a 1000x aumentos en MTB (Figuras 30, 31 y 32).

#### 4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

Tras realizar el análisis termogravimétrico a la MPTA, para averiguar cómo se comporta la membrana en términos de masa con un incremento lineal de la temperatura a lo largo del tiempo, los resultados obtenidos son los siguientes (Figura 33):

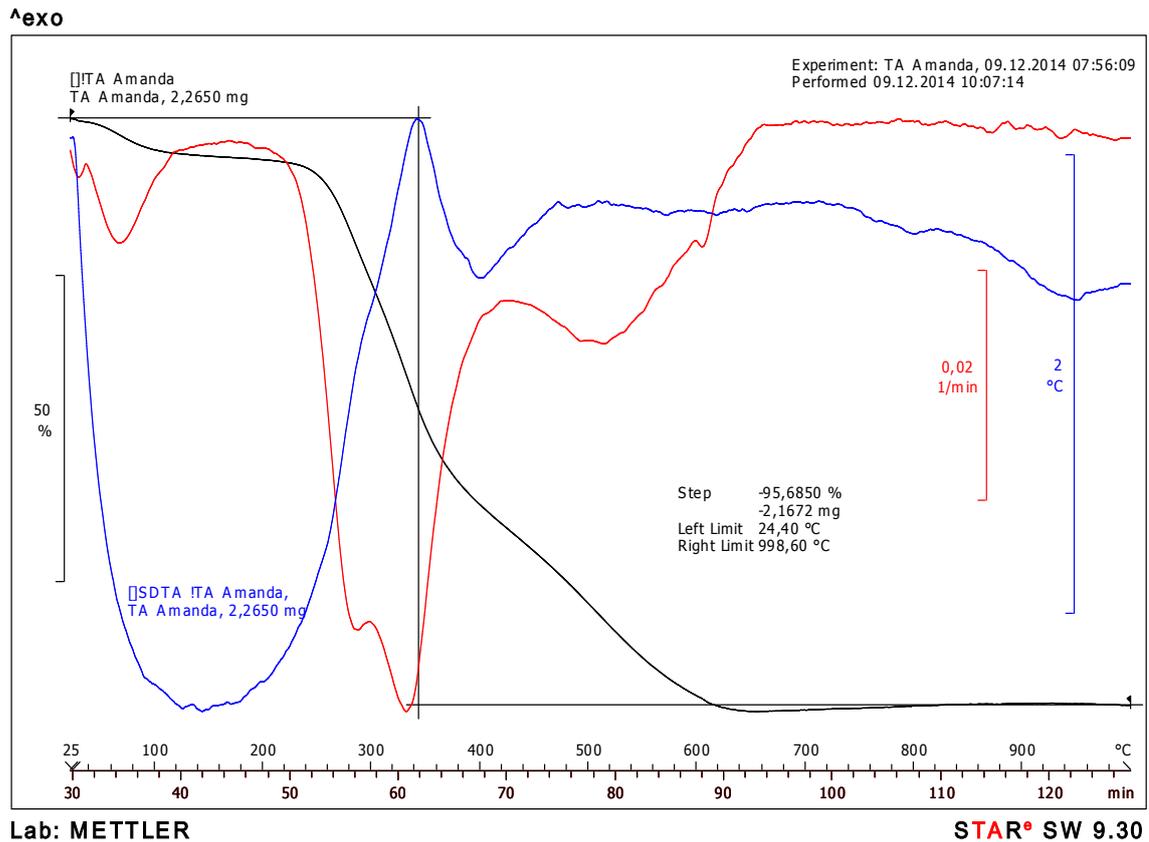


Figura 33. Gráfica que muestra la respuesta de la muestra al incremento de temperatura.

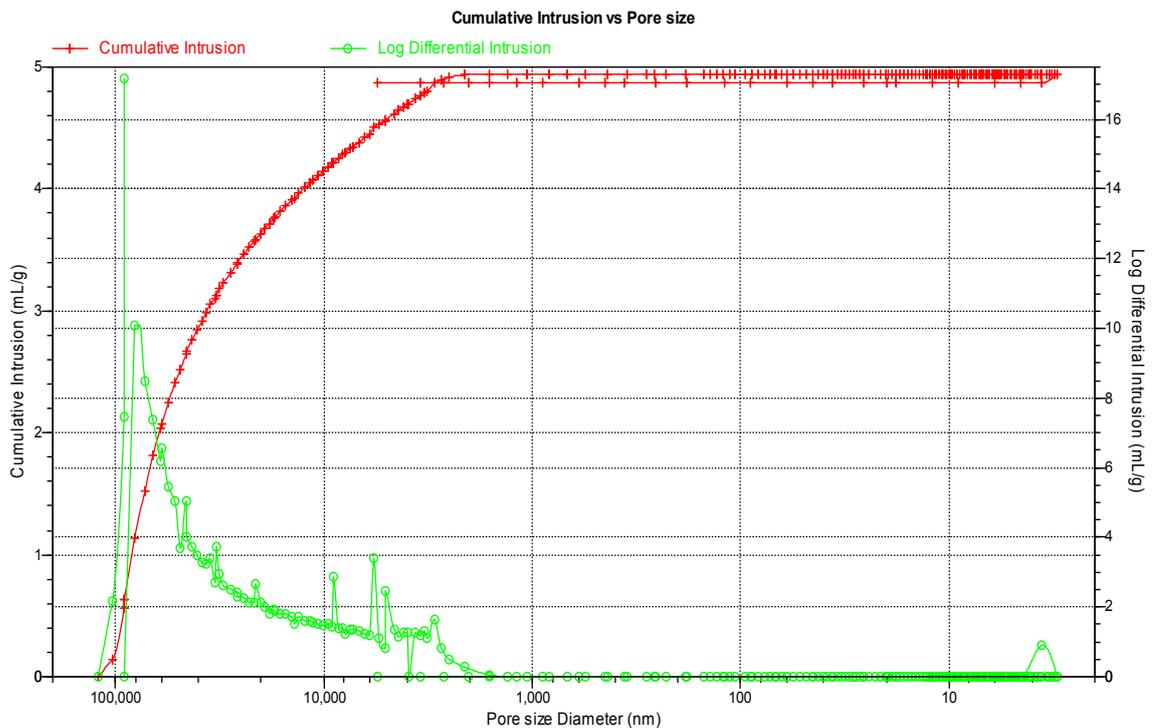
La curva negra muestra la pérdida de masa por parte de la MPTA con la temperatura. Se aprecia como la membrana comienza a descomponerse (perder masa) entre los 220°C y los 230°C, comportándose hasta entonces como un material bastante resistente. A partir de los 600°C pierde toda la materia.

La curva roja representa la variación de la temperatura con respecto al tiempo. Se pueden observar dos picos bastante definidos, el primero a 290°C y el segundo a 320°C. Son los dos puntos donde se produce mayor pérdida de masa debido a la temperatura.

Se puede concluir por tanto, que la membrana de la cáscara de huevo sometida al tratamiento A es un material bastante inerte, o lo que es lo mismo, bastante resistente, pues no comienza a perder masa hasta los 290-320°C y además resiste temperaturas de hasta 600°C antes de descomponerse.

### 4.3 Porosimetría

Para seguir caracterizando a la membrana de la cáscara de huevo, se realizó una prueba de porosimetría a MPTA, para conocer si se trata de un material micro, meso o macroporoso. Los resultados obtenidos se detallan en la *Figura 34*.



*Figura 34. Gráfica de porosidad correspondiente a la superficie de MPTA.*

Esta gráfica de porosidad (*Figura 34*), indica que el tamaño de poro que posee la superficie de la membrana de la cáscara de huevo sometida a tratamiento A (MPTA) es de unos 90 nm, lo que indica que se trata de un material macroporoso según la clasificación de poros de la IUPAC (*Figura 35*) (Sing et al., 1985).

>2 nm	• Microporoso
2-50 nm	• Mesoporoso
>50 nm	• Macroporoso

*Figura 35. Clasificación de poros de la IUPAC.*

#### 4.4 Adsorción-desorción de nitrógeno

Una prueba complementaria a la anterior es la de adsorción-desorción de nitrógeno. Con los resultados obtenidos (*Figuras 36 y 37 y Tabla 3*) se podrá comprobar si la MPTA es un material macroporoso como indica la porosimetría.

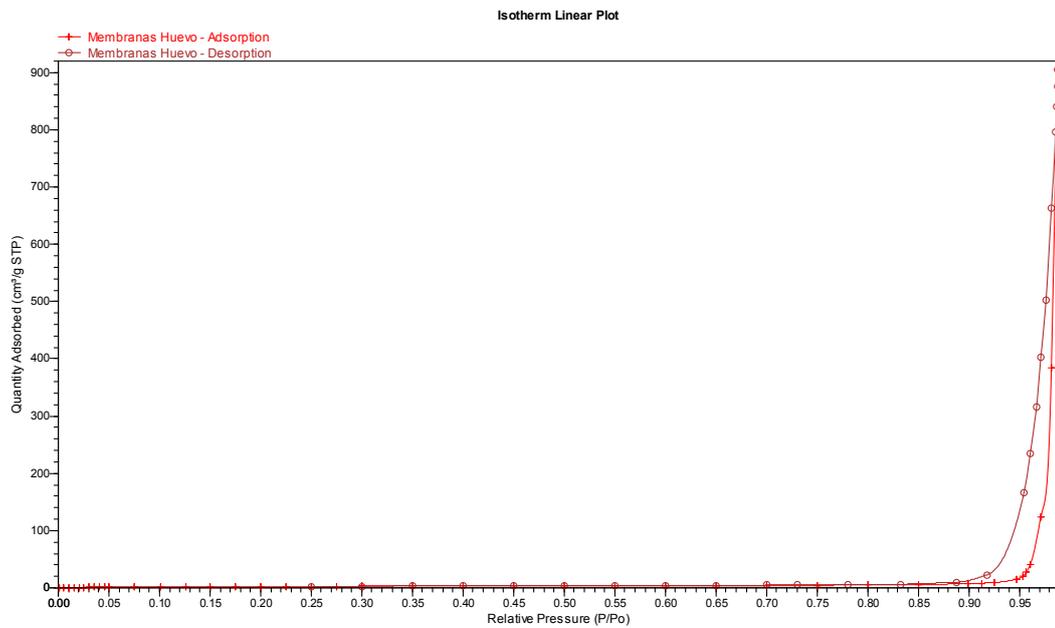


Figura 36. Gráfica ASAP de MPTA.

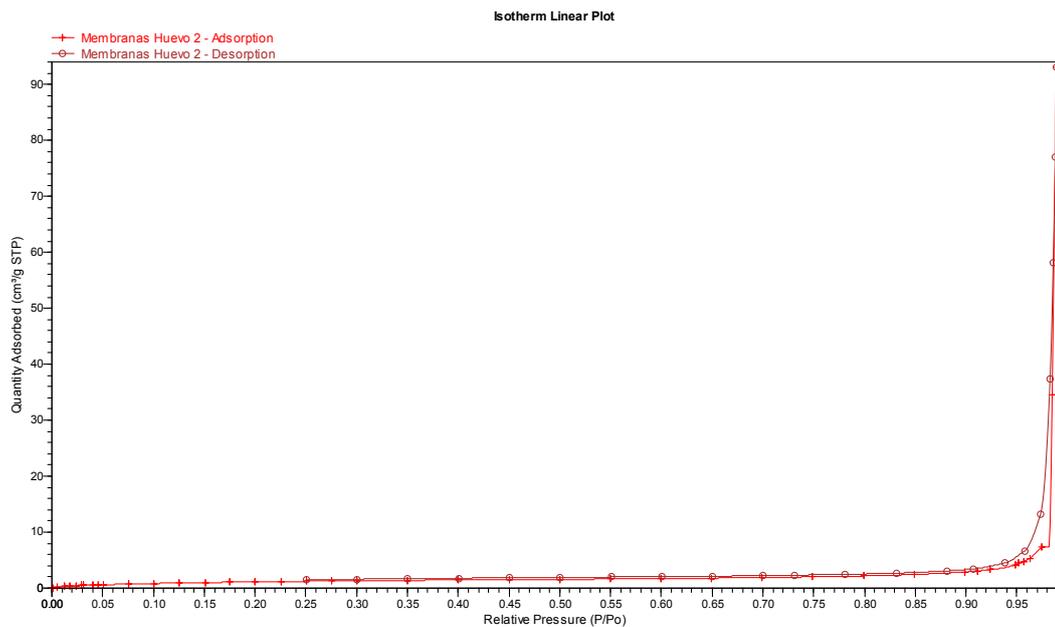


Figura 37. Gráfica ASAP de MPTB.

Tabla 3. Área BET obtenida según el tratamiento aplicado.

TRATAMIENTO	ÁREA BET (m <sup>2</sup> /g)
A	9.4556
B	4.4916

En ambos casos, y de acuerdo con la clasificación *Brunauer, Deming, Deming and Teller* denominada clasificación *BDDT* (Figura 38) (Brunauer et al., 1940) o clasificación de Brunauer (Brunauer, 1945) la isoterma es de tipo III.

TIPO I	• Sólido microporoso
TIPO II	• Sólido macroporoso o no poroso
TIPO III	• Sólido macroporoso o no poroso . Interacción adsorbato-adsorbente baja
TIPO IV	• Sólido mesoporoso
TIPO V	• Sólido mesoporoso. Interacción adsorbato-adsorbente débil
TIPO VI	• Sólidos con superficie no porosa y poco uniforme

Figura 38. Tipos de isotermas según la clasificación BDDT.

Dicha isoterma está muy desplazada hacia la derecha, no hay casi ciclos de histéresis (Figuras 36 y 37), y además, el área superficial (área BET) es muy pequeña para los dos casos (Tabla 3), lo que indica que estamos ante dos materiales con pobre capacidad porosa, pues este tipo de isoterma es típica de materiales no porosos (con huecos abiertos) o macroporosos donde la interacción adsorbato-adsorbente suele ser baja, dato que confirma el área BET.

#### 4.5 Determinación de proteínas

Se realizó este ensayo tanto para MTA como para MTB, los resultados obtenidos se resumen en la *Tabla 4*.

*Tabla 4. Resumen de los resultados obtenido con el método Kjeldahl.*

TRATAMIENTO	% N	% PROTEÍNA
A	14.40	89.98
B	14.74	92.11

Los datos desprenden que las diferencias tanto en el contenido de nitrógeno, como en el de proteína son insignificantes entre ambos tratamientos, siendo para ambos muy elevado.

#### 4.6 Capacidad de retención de proteínas

Para el estudio de la capacidad de retención de proteínas por parte de la membrana de la cáscara de huevo, se llevaron a cabo numerosos ensayos en los cuales las variables se fueron modificando en función de los resultados obtenidos en cada uno de ellos. Dichos ensayos se resumen en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Resumen de todos los ensayos realizados para determinar la capacidad de retención de proteínas

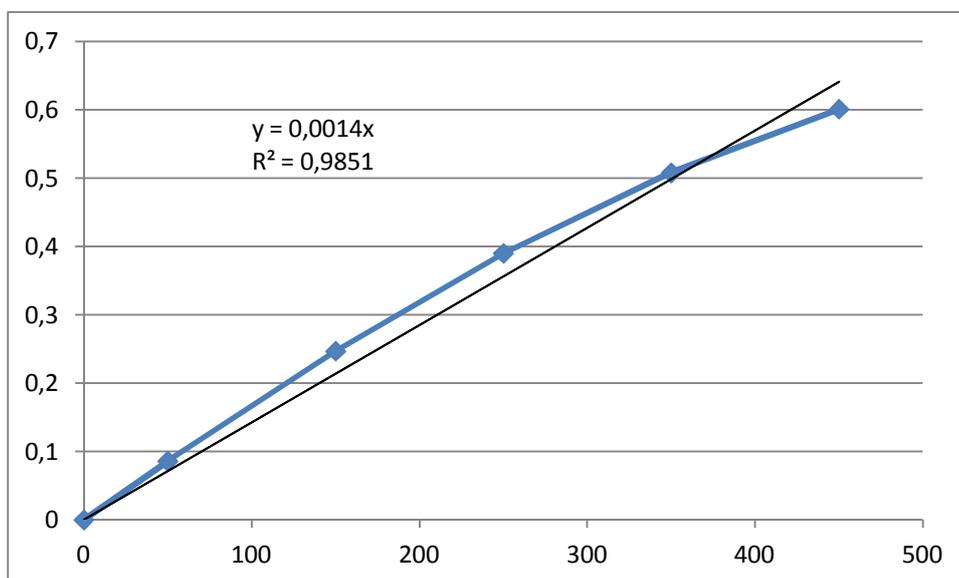
ENSAYO	TIPO DE MEMBRANA	TIPO DE PROTEÍNA	RELACIÓN L/S	CONC.PROT (ppm)	pH	TIEMPO AGITACIÓN (h)
I	MPTA	BSA	500	1000	5.5	2
II	MPTB	BSA	250	500	5,6,7	>12
III	MPTB	BSA	250	500	6	>12
IV	MPTB	BSA	250	500	7	>12
V	MPTB	BSA	250	500	6	2
VI	MPTB	BSA + OVA	250	100	7.5 8.5	>12
VII	MPTB	OVA	250	100, 500	8.5	>12
VIII	MPTB	OVA	250	100 250, 500, 750, 1000	8.5	>12
IX	MPTB	OVA	250	300 500	8.5	8
X	MPTB	OVA	250	400	8.5	8
XI	MPTB	OVA	250	200	8.5	8
XII	MPTB	OVA	250 250	50 100	8.5	8

Inicialmente se comenzó trabajando con la proteína seroalbúmina bovina (BSA), debido a que es una proteína extensamente empleada en ensayos de este tipo, pero como se detalla a continuación los resultados no fueron positivos, por lo que se decidió trabajar con la proteína ovoalbúmina (OVA), pues se sospecha que el tamaño de la BSA es el factor que interviene negativamente en la retención de esta por la membrana.

#### 4.6.1 Ensayo I

En esta primera prueba se trabajó con MTA, tanto con su fracción en polvo (tamizada) como con su fracción gruesa (no tamizada). El objetivo era estudiar si este tratamiento favorece la adsorción de proteínas. La proteína empleada fue la

seroalbúmina bovina (BSA) y la relación líquido/sólido fue de 500. En la *Figura 39* se muestra la recta patrón obtenida.



*Figura 39. Recta de calibrado típica. Obtenida en el ensayo I.*

*Tabla 6. Resumen de resultados obtenidos en el ensayo I. Siendo  $C_i$  la concentración de proteína inicial;  $C_{eq}$  la concentración de proteína en el equilibrio y  $Q$  la capacidad de retención de proteína por parte de la membrana.*

TIPO DE MEMBRANA	$C_i$ (ppm)	$C_{eq}$ (ppm)	$Q$ (mg/g)
Tamizada	985	967	4.5
No tamizada	985	1002	0

Como se observa en la *Tabla 6*, la retención de BSA por la MTA ha sido muy baja o nula.

#### 4.6.2 Ensayo II

Como los resultados en el ensayo I no fueron muy favorables, se pasó a trabajar con MTB tamizada, para averiguar si con este tratamiento se mejora la capacidad de retención de proteínas con respecto a MTA. De nuevo se trabajó con BSA.

En este caso, se cambió la proporción líquido/sólido, que pasa a partir de ese momento a ser de 250 y además, se pasó a controlar también el pH, trabajando con

diferentes valores con la finalidad de estudiar si este parámetro influye en la retención de proteínas por parte de la membrana. Los pH utilizados fueron 5, 6 y 7.

Los resultados obtenidos de la capacidad de adsorción de MTB se resumen en la *Tabla 7*.

*Tabla 7. Resumen de resultados obtenidos en el ensayo II.*

<b>pH</b>	<b>Ci (ppm)</b>	<b>Ceq (ppm)</b>	<b>Q (mg/g)</b>
5	290.22	261.33	7.22
6	305.11	233.11	18
7	232.89	194	9.75

En esta ocasión, la capacidad de retención aumentó notablemente con respecto al ensayo I, de lo que se puede deducir que el tratamiento B que se le aplica a las membranas es más efectivo que el A, con respecto a la adsorción de proteínas.

Como parece ser que a pH 6 los resultados son más positivos, se decidió seguir en esa dirección, realizando otro ensayo a dicho valor para confirmar los resultados obtenidos.

#### 4.6.3 Ensayo III

Se estudió la retención de proteínas con dos disoluciones distintas de BSA a pH 6. Los resultados obtenidos se detallan en la *Tabla 8*.

*Tabla 8. Resumen de resultados obtenidos en el ensayo III.*

<b>Disolución de BSA</b>	<b>Ci (ppm)</b>	<b>Ceq (ppm)</b>	<b>Q (mg/g)</b>
A	612	560	13
B	537.34	492	11.35

Los resultados obtenidos son favorables pero algo por debajo de los obtenidos en el ensayo II. Por lo tanto, se hizo necesaria una cuarta prueba para averiguar por qué los resultados eran tan heterogéneos, aún trabajando siempre con el mismo procedimiento y bajo las mismas condiciones.

#### 4.6.4 Ensayo IV

Para conocer si los problemas de retención que estaban apareciendo eran debidos a que la MTB se pudiera inestabilizar al ajustar el pH, se pasó a trabajar con una solución tamponada a pH 7 (*Trizmar hydrochloride solution*). Tras llevar a cabo el método *Lowry* los resultados obtenidos en cuanto a retención de proteína se representan en la *Tabla 9*.

*Tabla 9. Resumen de resultados obtenidos en ensayo IV.*

pH (tamponado)	Ci (ppm)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
7	171.43	174.29	0

Se obtuvo una capacidad de retención (Q) nula, lo que quiere decir que la MTB no retiene nada de BSA.

Como consecuencia de que en los ensayos realizados hasta ahora no parecían salir datos lógicos, pues siguiendo el mismo protocolo a veces eran positivos y a veces no, se decidió modificar ligeramente dicho protocolo, pero esta vez en cuanto al tiempo de agitación, por si fuera que las más de 12 horas que la MTB pasaba agitándose en contacto con la disolución de BSA generase algún tipo de reacción indeseable que alterase los resultados.

#### 4.6.5 Ensayo V

Para intentar solucionar el problema anteriormente mencionado, se procedió a reducir drásticamente el tiempo de agitación, bajándolo desde más de 12 horas a solo 2

horas. Y además, para controlar aún más el proceso, se cogió muestra a los 20, 40, 60 y 120 minutos.

Como la disolución tamponada a pH 7 no pareció funcionar muy bien, se volvió a ajustar el pH a 6 con NaOH 0.1 N. Los resultados finales se reflejan en la siguiente tabla (*Tabla 10*):

*Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos en ensayo V.*

<b>TIEMPO DE AGITACIÓN (min)</b>	<b>Ci (ppm)</b>	<b>Ceq (ppm)</b>	<b>Q (mg/g)</b>
0	533.33	533.33	-
20	533.33	524	2.33
40	533.33	517.33	3.47
60	533.33	518.67	2.69
120	533.33	517.33	2.4

Se puede apreciar que la retención es muy baja, por lo que se podría pensar que la mayor parte de la BSA se adsorbía por encima de las 2 horas de agitación. Además, este ensayo no terminaba de aclarar el por qué de la heterogeneidad en los resultados recabados en los últimos cuatro análisis.

#### **4.6.6 Ensayo VI**

Como todos los intentos realizados hasta ahora no aclaraban mucho a cerca de la capacidad de retención de proteína por parte de la MTB, pues la heterogeneidad era muy alta, cabía la posibilidad de que fuese la propia proteína BSA la que pudiera estar dando problemas debido a su tamaño. Es por eso que se decidió emplear otra proteína más pequeña como puede ser la ovoalbúmina (OVA), y evaluarla en paralelo con la BSA. Además, se intentó hacer el ensayo a pH no estudiados hasta ahora, como son 7.5 y 8.5, ajustando el valor de nuevo con NaOH 0.1 N. Tras medir con el método de Lowry, los resultados obtenidos se esquematizan en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Resultados obtenidos en el ensayo VI.

PROTEÍNA	pH	Ci (ppm)	Ceq (ppm)	Q(mg/g)
BSA	7.5	121.33	116	1.33
BSA	8.5	130.67	125.33	1.34
OVA	7.5	129.33	52	19.33
OVA	8.5	134.67	46	22

Los resultados en esta ocasión fueron bastante esclarecedores, pues la diferencia en la capacidad de retención entre la BSA y la OVA era elevada, siendo bastante mayor en el caso de la OVA. Así que se puede pensar que la retención se produce por un proceso de adsorción física, donde el tamaño de la proteína es un factor que influye en la capacidad de retención por parte de la MTB.

#### 4.6.7 Ensayo VII

Como en el anterior ensayo se vio con claridad que los resultados obtenidos con la proteína OVA eran mejores que los obtenidos con la BSA, todas las pruebas que se realizaron a partir de ese momento fueron con la ovoalbúmina, pudiendo variar el resto de parámetros para así, llegar a conseguir un resultado claro y homogéneo.

En esta ocasión, y puesto que los resultados fueron ligeramente más favorables a este valor, se trabajó a un pH de 8.5, y además se hizo el ensayo a dos concentraciones de OVA diferentes, a 100 y 500 ppm. Tras realizar el método de Lowry, los resultados finales fueron los siguientes (Tabla 12):

Tabla 12. Resultados obtenidos en ensayo VII.

PROTEÍNA	pH	Ci (ppm)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
OVA	8.5	133.75	21.25	28.13
OVA	8.5	562.5	112.5	112.5

De nuevo los resultados obtenidos fueron positivos, pues se produjo retención de ovoalbúmina bajo estas condiciones, y además con una capacidad de retención bastante elevada, sobretodo en el caso en el que se trabajaba con una disolución de OVA de 500 ppm.

#### 4.6.8 Ensayo VIII

Como en la anterior prueba salieron resultados muy favorables, se intentó desarrollar el estudio más en profundidad con las mismas propiedades, pero esta vez se ensayó a cinco concentraciones diferentes, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm. Y además, se hizo en paralelo y por duplicado (*Tabla 13*).

*Tabla 13. Resultados obtenidos en el ensayo VIII.*

<b>CONCENTRACIÓN PROTEÍNA (ppm)</b>	<b>Ceq (ppm)</b>	<b>Q (mg/g)</b>
100	93.33	15.67
100	117.3	9.67
250	242.7	20.67
250	153.3	43
500	536	20
500	550.7	16.33
750	737.3	11
750	730.7	12.67
1000	954.7	14.67
1000	981.3	8

Ocurre que a pesar de que de nuevo la MTB retuvo bastante proteína, los datos fueron muy heterogéneos incluso trabajando con la misma concentración de OVA. El motivo puede ser un error experimental derivado de trabajar con cantidades muy pequeñas tanto de membrana como de proteína, pues esto favorece la aparición de errores significativos.

#### 4.6.9 Ensayo IX

Para averiguar que ocurre y si es un problema derivado de un error experimental, se repitió exactamente el mismo ensayo pero en esta ocasión solo a 300 y 500 ppm de OVA.

Otra variante del procedimiento que se introdujo aquí, es el tiempo de agitación, que en esta ocasión fue de 8 horas (y no 12 como se estaba haciendo hasta ahora) por cuestiones de logística. En este tiempo, se sacó muestra a 1, 2, 3, 5 y 8 horas, para seguir más de cerca la adsorción de las proteínas e intentar esclarecer el motivo de la heterogeneidad en los resultados.

Los datos obtenidos a 300 ppm se detallan a continuación (*Tabla 14 y Figuras 40 y 41*).

*Tabla 14. Resultados obtenidos en el ensayo IX, para una disolución de OVA de 300 ppm.*

TIEMPO (h)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
1	285.71	6.79
1	294.29	4.64
2	288.57	5.06
2	284.29	5.95
3	281.43	5.24
3	272.86	6.67
5	238.57	9.29
5	244.29	8.57
8	68.57	20.36
8	151.43	13.45

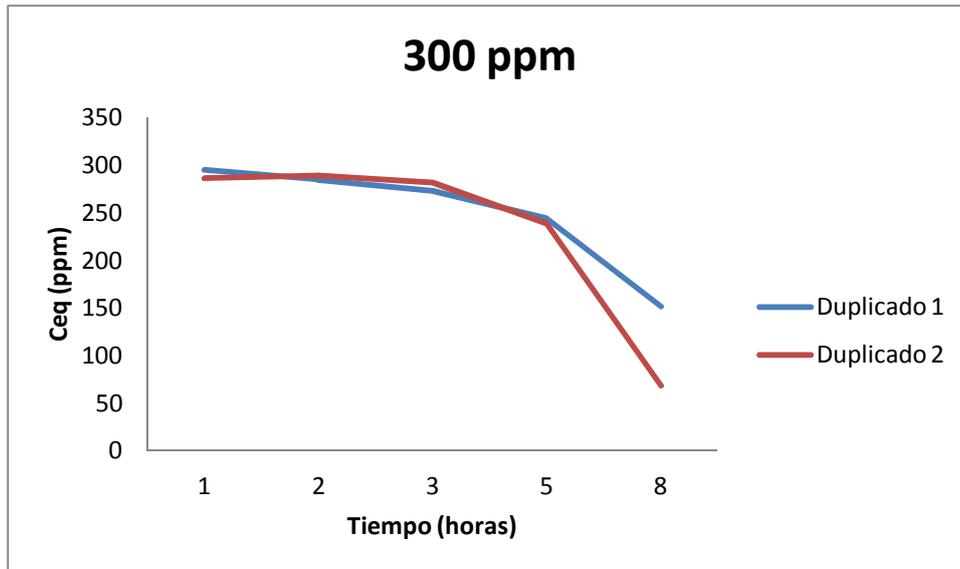


Figura 40. Representación de la concentración en equilibrio frente al tiempo.

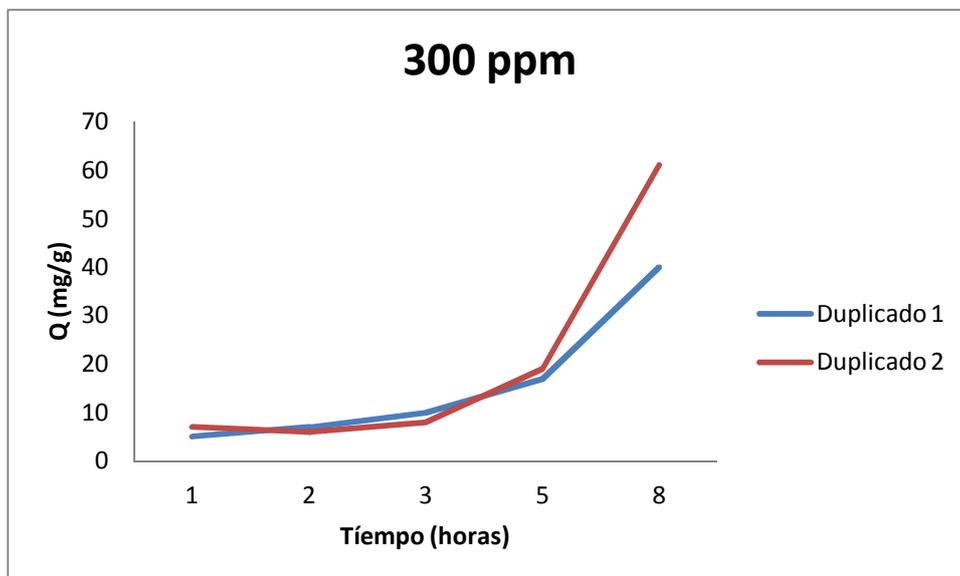


Figura 41. Representación de la capacidad de retención frente al tiempo.

La progresión en cuanto a retención de proteína que sigue la MTB es buena, pero como bien indican los datos y como también se puede ver en las gráficas, es en el último punto, a las 8 horas de reacción, donde los datos pierden homogeneidad, ya que en el *Duplicado 1* se retiene 20.36 mg/g de OVA, mientras que en el *Duplicado 2* se retiene 13.45 mg/g. Esto pudiera deberse a un error experimental, pues al trabajar con cantidades muy pequeñas, el mínimo error en alguno de los pasos del análisis puede llevar a estas diferencias finales tan notorias.

Los resultados obtenidos a 500 ppm se detallan a continuación (*Tabla 15*)

*Tabla 15. Resultados obtenidos en el ensayo IX, para una disolución de OVA de 500 ppm.*

TIEMPO (h)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
1	405.71	27.86
1	405.71	27.86
2	352.86	34.23
2	392.86	25.89
3	368.57	24.76
3	348.57	28.1
5	302.86	26.79
5	374.29	17.86
8	151.43	30.48
8	311.43	17.14

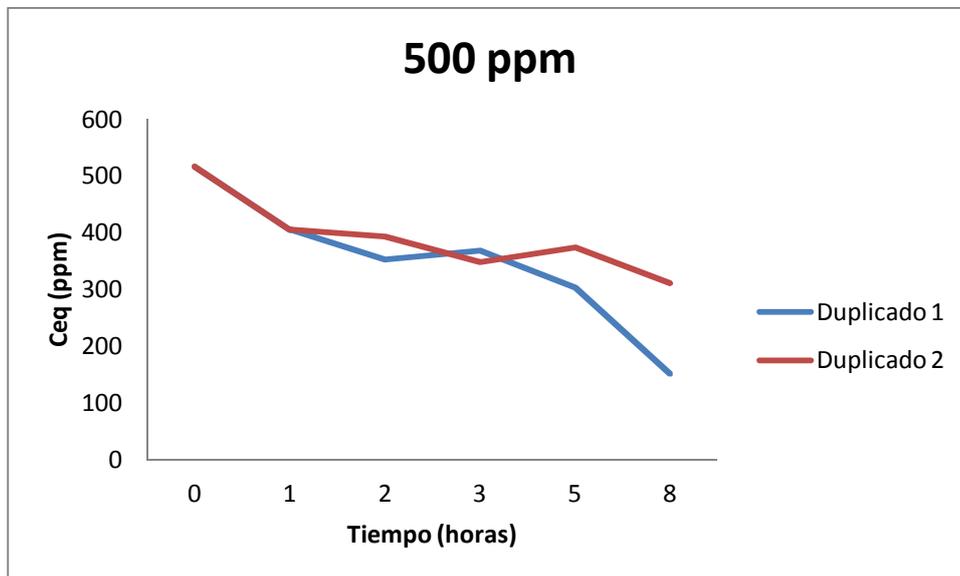


Figura 42. Representación de la concentración en equilibrio frente al tiempo.

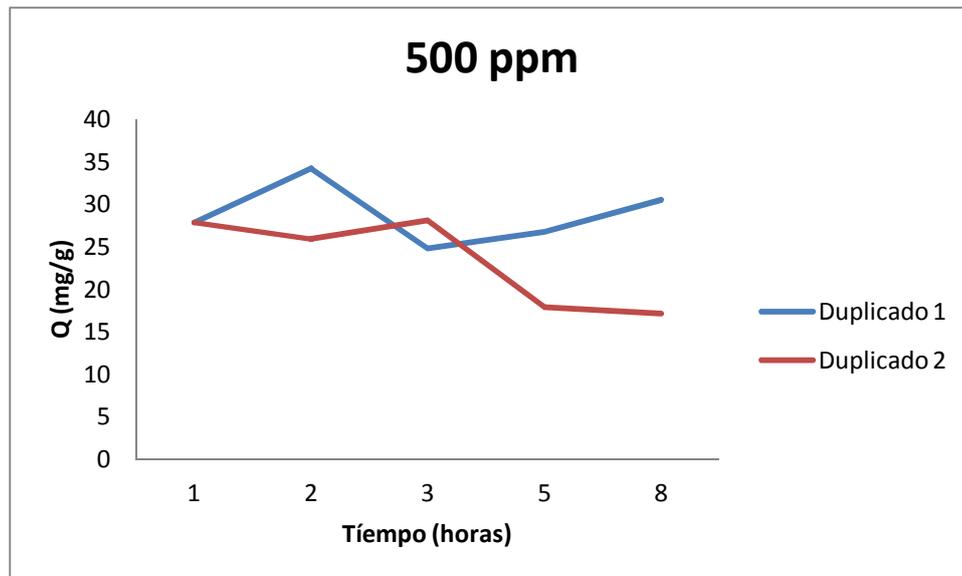


Figura 43. Representación de la capacidad de retención frente al tiempo.

De nuevo aquí los resultados son bastante heterogéneos, aunque se puede apreciar de igual forma que en las primeras horas de ensayo es donde se produce más retención de proteína, estancándose el proceso según avanza el tiempo (Figuras 42 y 43).

#### 4.6.10 Ensayo X

Para completar los datos obtenidos hasta el momento, se trabajó en esta ocasión con una disolución de OVA de 400 ppm, y además en las 8 horas en las que se mantuvo en agitación la MTB en contacto con dicha disolución, se sacó muestra por duplicado a las 4 horas y a las 8 horas. Los datos obtenidos son los siguientes (Tabla 16):

Tabla 16. Resultados obtenidos en el ensayo X.

TIEMPO (h)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
4	377.14	15.04
4	338.57	24.62
8	365.71	13.1
8	320	21.48

Los resultados parecen indicar, que la mayor parte de la proteína es adsorbida en las primeras 4 horas de análisis, pues la capacidad de retención (Q) a las 8 horas, es similar a la obtenida a las 4 horas. Esto parece coincidir con lo obtenido en el anterior ensayo, pues se puede observar una cierta tendencia hacia una mayor retención en las primeras horas, viéndose una reducción de esta capacidad en las últimas horas. Para comprobar si esta tendencia es constante, se realizó otro ensayo.

#### 4.6.11 Ensayo XI

Para tener un abanico amplio de resultados, se decidió repetir exactamente el mismo procedimiento que en los ensayos X y XI, solo que en esta ocasión se empleó una concentración de OVA de 200 ppm. De nuevo se hizo por duplicado, y sacando muestra a las 4 y 8 horas.

*Tabla 17. Resultados obtenidos en el ensayo XI.*

TIEMPO (h)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
4	101.33	23.99
4	132	16.33
8	41.33	28.59
8	66.67	23.95

En esta ocasión, parece que en las 4 últimas horas de ensayo se sigue adsorbiendo proteína, pero como se puede apreciar observando los datos de la *Tabla 17*, la retención más significativa se produce en las primeras 4 horas.

#### 4.6.12 Ensayo XII

Para dar por finalizado el análisis de retención de proteínas, se hizo un último ensayo en el que se trabajó con concentraciones de OVA de 50 y 100 ppm, para así completar los datos obtenidos a 200, 300, 400 y 500 ppm.

El procedimiento fue exactamente el mismo que el llevado a cabo en los anteriores ensayos, donde se sacaba muestra a las 4 y 8 horas tras haber dado comienzo el análisis. Los resultados se resumen en las *Tablas 18 y 19*.

Tabla 18. Resultados obtenidos con una concentración de OVA de 50 ppm.

TIEMPO (h)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
4	46.67	6.33
4	66	1.5
8	48.67	4.86
8	68	0.83

Tabla 19. Resultados obtenidos con una concentración de OVA de 100 ppm.

TIEMPO (h)	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
4	119.33	1.84
4	115.33	2.84
8	148.67	0
8	122	0.97

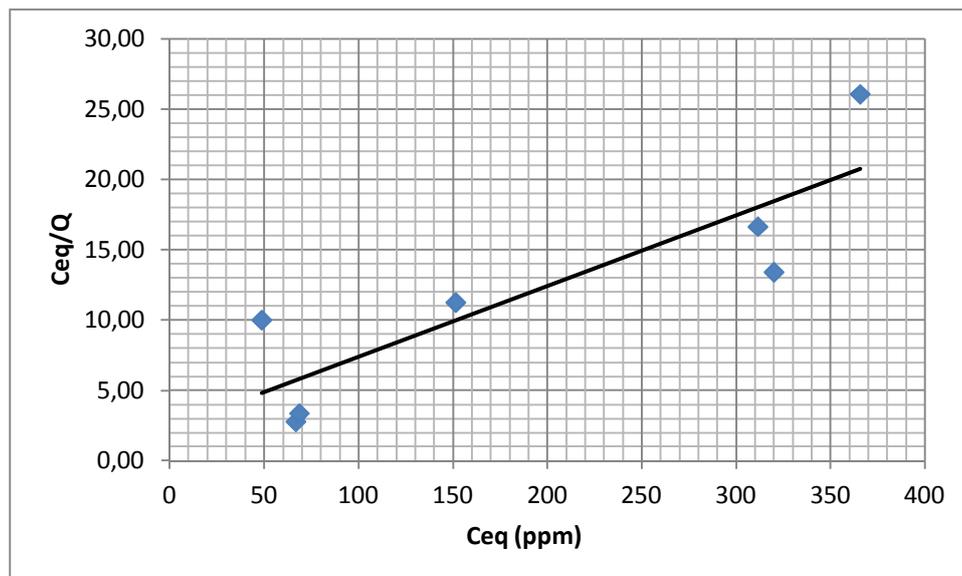


Figura 44. Isoterma de Langmuir para 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.

La isoterma de Langmuir es:

$$q_{ei} = \frac{K_{eq} \times q_m \times C_{e,i}}{1 + K_{eq} \times C_{e,i}}$$

Y la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) se calcula a partir de:

$$\frac{1}{q_m \times k_{eq}}$$

Siendo esta la expresión que define el punto donde la isoterma corta el eje de ordenadas, que es aproximadamente 2 (*Figura 44*). Por lo tanto, y sabiendo que  $q_m$  está en torno a 20, al despejar se obtiene que  $K_{eq}$  es de 0.025.

#### 4.7 Capacidad de desorción de proteínas

Una vez comprobado que la membrana de la cáscara de huevo retiene proteínas, el siguiente paso que se llevó a cabo fue comprobar si esta retención era reversible o no, y en el caso de serlo, cuanta proteína quedaba retenida en su superficie tras el proceso de desorción.

##### 4.7.1 Ensayo I

En primer lugar, se realizó una desorción de proteínas de las membranas que se emplearon en los últimos ensayos, y que en su momento habían sido almacenadas bajo condiciones de congelación. Para esto se utilizó como eluyente NaOH 0.25 M en una relación líquido/sólido de 20:1. Los resultados obtenidos se detallan en la *Tabla 20*.

Tabla 20. Resultados de desorción obtenidos empleando membranas que habían retenido a diferentes concentraciones.

Muestra	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
50 ppm	59	1.18
100 ppm	43.3	0.87
200 ppm	52.33	1.05
300 ppm	22.47	0.45

Como indican los resultados, la cantidad de OVA que se desprendió de las membranas que habían retenido a 50, 100, 200 y 300 ppm, fue muy baja, por lo que se puede deducir que la retención de proteína OVA con este procedimiento es irreversible. Para comprobar esto, se llevó a cabo otro ensayo, en el que se aplicó el mismo protocolo pero donde el NaOH empleado estaba más concentrado.

#### 4.7.2 Ensayo II

Se trabajó bajo las mismas condiciones que en la anterior prueba, solo que en esta ocasión se utilizó un NaOH 1M, para a ver si de esta manera se conseguía liberar más proteína de las membranas. En este ensayo solo se pudo utilizar las membranas con proteína retenida a 50, 100 y 300 ppm, porque la muestra a 200 ppm se agotó en la anterior prueba. Los resultados se esquematizan en la *Tabla 21*.

Tabla 21. Resultados de desorción obtenidos empleando membranas que habían retenido a diferentes concentraciones.

Muestra	Ceq (ppm)	Q (mg/g)
50 ppm	10.67	0.21
100 ppm	22	0.44
300 ppm	7.33	0.15

De nuevo, los resultados son muy similares. La cantidad de proteína liberada en el proceso de desorción es muy baja, por lo que aquí también se puede concluir que la retención de proteína OVA por parte de la membrana de la cáscara de huevo es un proceso irreversible.

Para hacer una última comprobación, se lleva a cabo con esas mismas muestras, un ensayo de retención de OVA, para cerciorar que la superficie de las membranas está totalmente ocupada por la proteína, como se puede deducir de los resultados obtenidos en los ensayos I y II. De forma que si la retención es nula o muy baja, se confirmaría la retención irreversible, pero si por el contrario retiene una cantidad de OVA importante los resultados obtenidos hasta ahora no serían fiables, pues serían totalmente contradictorios.

#### 4.7.3 Ensayo III

Bajo el mismo protocolo empleado en los ensayos de retención de proteínas realizadas con anterioridad, se llevó a cabo este ensayo. Se hicieron disoluciones de OVA a 50, 100 y 300 ppm, y se mantuvieron en contacto con su respectiva membrana en agitación durante 8 horas, en las que se sacó muestra a las 4 y 8 horas.

La retención fue completamente nula, por lo que se confirman los resultados conseguidos en los dos anteriores ensayos, la retención de proteína por parte de la membrana de la cáscara de huevo es irreversible.

#### 4.8 Retención de cobre

Los resultados obtenidos tras los tres ensayos realizados para estudiar la retención de cobre por parte MTA, son los siguientes:

##### 4.8.1 Ensayo I

Tabla 22. Resultados obtenidos en el ensayo I.

	INICIAL	FINAL
<b>Cu (ppm)</b>	103	95
<b>Q (mg/g)</b>	-	27

Este primer análisis muestra que MTA sí retiene cobre y que además tiene una capacidad de retención de 27 mg/g (*Tabla 22*).

Para hacer una segunda y exhaustiva comprobación, se repitió el proceso con las mismas condiciones, solo que en esta ocasión se sacó muestra a diferentes tiempos para poder ver en detalle lo que ocurre durante el proceso.

#### 4.8.2 Ensayo II

La retención de cobre por parte de la MTA a los 20, 40, 60, 120 y 180 minutos de reacción es la siguiente (*Tabla 23*).

*Tabla 23. Resultados obtenidos en el ensayo II.*

	<b>INICIAL</b>	<b>20´</b>	<b>40´</b>	<b>60´</b>	<b>120´</b>	<b>180´</b>
<b>Cu (ppm)</b>	95.6	94.3	10.2	93.7	93.9	97.7
<b>Q (mg/g)</b>	-	1.3	85.4	1.9	1.7	0

En esta ocasión, y sin saber muy bien el motivo, los datos fueron menos positivos que en el ensayo anterior, pues la capacidad de retención de cobre fue muy baja en todos los puntos. El valor de Q a los 40 minutos se puede interpretar como erróneo, por sobresalir en exceso con respecto al resto, debido quizás a un error experimental.

#### 4.8.3 Ensayo III

Como los resultados de los dos ensayos anteriores eran contradictorios, se repitió el mismo análisis por tercera vez, solo que en esta ocasión, tan solo se cogió muestra a los 60 y a los 120 minutos.

Tabla 24. Resultados obtenidos en el ensayo III.

	INICIAL	60´	120´
<b>Cu (ppm)</b>	105	95	93
<b>Q (mg/g)</b>	-	10	12

Finalmente, se observó que de nuevo la MTA es capaz de retener el cobre, aunque en esta ocasión con una capacidad inferior a la obtenida en el ensayo I (*Tabla 24*). Por lo que se puede concluir que la membrana posee capacidad de retener cobre, pero esta es demasiado variable.

## 4.9 Formación de geles

### 4.9.1 Transglutaminasa

Los resultados obtenidos en este ensayo no fueron los esperados, pues no se consiguió generar ninguna estructura que pareciese un gel. El motivo puede ser, o bien que las proporciones empleadas de agua, membrana y enzima no eran las correctas, o simplemente que no hay suficiente proteína en la membrana de la cáscara de huevo como para que la enzima pudiese actuar. Para salir de dudas, se decidió llevar a cabo más experimentos con diferentes concentraciones de los tres elementos mencionados hasta ahora, para a base de ensayo y error conseguir dar con la fórmula adecuada. En la *Tabla 25* se resumen las cantidades.

Tabla 25. Cantidades empleadas en los diferentes ensayos.

ENSAYO	MTA (g)	AGUA (mL)	ENZIMA (g)
Inicial-A	0.15	3.5	0.3
B	0.15	3.5	0.6
C	0.08	1.5	0.3

El material obtenido en los ensayos B y C respondían más como una estructura tipo gel que el ensayo inicial (A), pero aun así la estructura que se generó no fue lo

suficientemente resistente y homogénea para poder considerarla un gel como tal (Figura 45).



Figura 45: Imagen de la estructura tipo gel generada en los ensayos B y C.

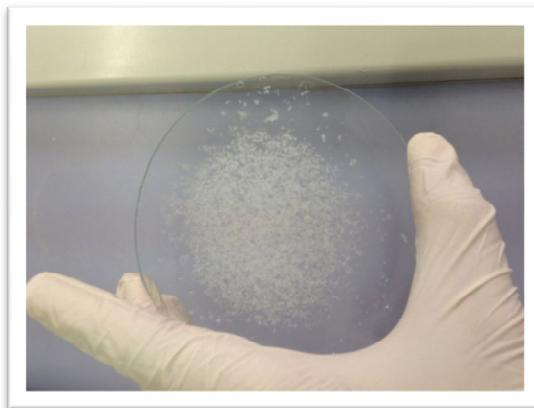
#### 4.9.2 Ácido oleico

Debido a las características singulares del material con el que se está trabajando, se fue modificando el protocolo inicial en función de los resultados. Es por ello que se llevaron a cabo numerosos ensayos para intentar conseguir generar un gel. En los seis primeros el material utilizado fue MTA, en los demás fue MST. A continuación se detalla cada uno de los ensayos llevados a cabo (Tabla 26).

Tabla 26. Cantidades empleadas en los diferentes ensayos.

ENSAYO	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD MUESTRA (g)	AMONIO (g)	AGUA DESTILADA (g)	ÁCIDO OLEICO (μl)
I	MPTA	0.206	0.526	22.286	400
II	MGTA	0.205	0.517	10.038	400
III	MGTA	0.205	0.525	10.007	800
IV	MGTA	0.207	0.582	10.085	600
V	MPTA	0.205	0.555	10.016	800
VI	MPTA	0.203	0.583	10.051	600
VII	MPST	0.104	0.269	5.016	400

Con los ensayos I y II, se obtuvo lo que parecía un material cristalizado cuyos componentes no parecían mostrar unión entre ellos, y además estaba igual de líquido que en un principio (*Figura 46*). En definitiva, no se consiguió ninguna estructura similar a un gel.



*Figura 46. Material obtenido al finalizar el ensayo I.*

Como con estos dos primeros análisis no se consiguió el objetivo final, se llevaron a cabo otros cuatro ensayos (pero esta vez de forma paralela), en cada uno de los cuales se modificó algún factor, para de esta manera conseguir llegar a la fórmula que permitiese generar un gel con la membrana de la cáscara de huevo (*Tabla 26*).

Pasado el tiempo estipulado, en ninguno de los cuatro siguientes ensayos se consiguió algo similar a un gel, de nuevo aparecían estructuras disgregadas dentro de un medio líquido, lo que evidentemente no servía.

En el último ensayo, se decidió hacer algo diferente, y era trabajar con la MST en polvo. En esta ocasión, el resultado obtenido fue más satisfactorio, porque inicialmente se generó una sustancia mucosa que podría parecer un gel, pero pasado un tiempo de reposo esa capacidad viscosa se perdió por completo. Se volvió a agitar y se decidió añadir de nuevo la misma cantidad de ácido oleico, pero de nuevo no hubo respuesta viscosa.

### 4.9.3 Almidón y glicerol

En este ensayo no se obtuvo el resultado deseado, pues la intención era generar un gel y lo único que se consiguió fue un líquido con las membranas disgregadas en su interior (*Figura 47*). El material obtenido era completamente líquido, y la MPST no reaccionaba con ninguno de los materiales con los que se mezcló.



*Figura 47. Material obtenido al finalizar el ensayo.*

### 4.9.4 Gelatina

En esta ocasión sí se consigue crear una estructura tipo gel, pero en el que se aprecia con claridad como la membrana no forma parte de dicha estructura, si no que se encuentra disgregada sin formar parte del material. Es decir, si se genera el gel es gracias a la presencia de la gelatina, y no porque la membrana de la cáscara de huevo haya intervenido en el proceso.

## ***5 CONCLUSIONES***

- La membrana de la cáscara de huevo se trata de un material fibroso, macroporoso, bastante inerte y resistente, pues soporta temperaturas de hasta 320°C sin perder masa y hasta 600°C sin descomponerse. Además presenta un componente muy elevado en proteínas, llegando a tener en torno al 90% de proteína en su composición, siendo en su mayoría colágeno (tipo I, V y X).
- Debido a este alto contenido en colágeno y a su estructura macroporosa, cabría esperar cierta capacidad de retención de metales y aunque se ha podido demostrar su capacidad para retener cobre, esta es muy baja e irregular, por lo que su utilización para este fin no parece la mejor opción.
- En cuanto a la posibilidad de generar materiales tipo gel (debido de nuevo a su alto contenido en proteínas), se ha demostrado que la membrana de la cáscara de huevo es muy poco reactiva, al menos con los cuatro procedimientos empleados en este trabajo. Pues en todos los casos, no se consigue la consistencia necesaria y además se observa con claridad como la membrana no forma ninguna estructura con el resto de los componentes. La única excepción puede ser el caso en el que se emplea la enzima transglutaminasa, pues si se consigue algo similar a un gel, aunque no se puede definir como tal.
- Por su parte, la retención de proteínas por parte de la membrana ha obtenido resultados positivos, aunque variables en función de la proteína con la que se trabaje. En el caso específico de la seroalbúmina bovina (BSA), la capacidad de la membrana es baja e irregular, sin embargo, con la ovoalbúmina (OVA), esta capacidad aumenta considerablemente. Esto se debe a la relación entre el tamaño de la proteína y el tamaño de poro de la superficie de la membrana (90 nm), de manera que la OVA que es más pequeña que la BSA se adsorbe con mayor facilidad a dicha superficie. Con todo, esta adsorción es completamente irreversible con el método utilizado en este trabajo, con lo que la membrana de la cáscara de huevo no podría emplearse en procesos donde lo que interesa es recuperar la proteína retenida.

- Por lo tanto, se puede considerar la retención de OVA como una aplicación factible y real para la industria alimentaria a nivel de corrientes residuales de clara de huevo, con el fin de evitar la pérdida de ciertas proteínas, aunque para esto se hace indispensable conseguir la elución de la proteína.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BSA	Proteína Seroalbúmina Bovina.
Ceq	Concentración en el equilibrio.
Ci	Concentración inicial.
MG	Membrana gruesa (no tamizada).
MGST	Membrana gruesa sin tratar.
MGTA	Membrana gruesa sometida a tratamiento A.
MGTB	Membrana gruesa sometida a tratamiento B.
MP	Membrana en polvo (tamizada).
MPST	Membrana en polvo sin tratar.
MPTA	Membrana en polvo sometida a tratamiento A.
MPTB	Membrana en polvo sometida a tratamiento B.
MST	Membrana sin tratar.
MTA	Membrana sometida a tratamiento A.
MTB	Membrana sometida a tratamiento B.
OVA	Proteína ovoalbúmina.
Q	Capacidad de retención.
SEM	Microscopio electrónico de barrido.
TGA	Análisis termogravimétrico.
ppm	Partes por millón.

## ***6 BIBLIOGRAFÍA***

- Abdou, A.M, Mujo, K., and Kenji, S., 2013. Functional proteins and peptides of Hen´s Egg Origin. Capítulo 3: 115.
- Abu Diak, O., Bani-Jaber, A., Amor, B., Jones, D., and Andrews, G.P., 2007. *The manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings.* 285-286.
- Antón, M., Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Schede, R., 2007. Bioactive Eggs Compounds. Ed. Springer Cost. Capítulo 1: 1-6; capítulo 18: 117-137.
- Antón, M., Le Denmat, M., Beaumal, V. 2000. Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, 14, 539-549.
- Chambi, H. and Grosso, C. *Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase.* *Food Research International* 39 (2006) 458-466.
- De Santiago, C., 2012. *Fisorción nitrógeno.* Capítulo 3: 15-18.
- Gallegos, C., Martínez, I., Partal, P., García-Morales M., y Guerreo, A., 2013. *Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing.*
- Gupta, L.,Regional Technical Manager, Avitech, 2008. *Maintaining Egg Shell Quality.*
- Hernández Hernández, L., y González Pérez C., 2002. *Introducción al análisis instrumental.* Ed: Ariel. Capítulo 1: 18-19.

- Instituto de Estudios del Huevo, 2009. El gran libro del huevo. Ed Everest, S.A.
- Ishikawa S., Suyama K., Arihara K., e Itoh M., 2001. *Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane.*
- Li J., Liao X., Zhang Q., and Shi B., 2013. *Adsorption and separation of proteins by collagen fiber adsorbent.*
- Liao X., Zhang M., and Shi B., 2004. *Collagen-Fiber-Immobilized Tannins and Their Adsorption of Au (III).*
- López Fernández, A.M., 2014. *Intercambio iónico con resinas comerciales y sintetizadas para la retención de sulfamidas y tiocianatos en sistemas individuales y mezclados.* Tesis doctoral. 27, 32, 69-71.
- Márquez E., Arévalo E., Barboza Y., Benítez B., Rangel L., y Archile A., 2006. *Efecto de la concentración de transglutaminasa y tiempo de reacción en la estabilización de productos reestructurados.*
- Rendueles, M. 2014. Industrias cárnicas, de pescado y de huevo. Industrias Alimentarias. Máster en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo.
- Ríos, Y., 2010. *Diseño de productos reestructurados: la enzima transglutaminasa.* Área de nuevos alimentos de la Universidad de Investigación Alimentaria de AZTI-Tecnalia.
- Rivera Pinedo M. N., 2012. *Determinación de proteínas por el método Lowry y Bradford.*
- Skoog, D. A., Holler, F. J., and Nieman, T. A., 2003. *Principios del análisis instrumental.* Ed: McGrawHill. Capítulo 1: 3-4, 16, Apéndice a1C.

- Surgino, H., Nitoda, T., Juneja, L.R. 1997. *General Chemical Compositiom of hen eggs*. Ed. CRC Press. Capítulo 2: 13-24.
- Tang J., Li J., Kang J., Zhong L., and Zhang Y., 2009. *Preliminary studies of application of eggshell membrane as immobilization platform ins sándwich immunoassay*.
- Tang, C., Yang, M., Liu, F., and Chen, Z., 2013. *A novel process to efficiently form transglutaminase-set soy protein isolate-stabilized emulsion gels*. LWT- Food Science and Technology. ELSEVIER.
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Piaggio, F., e Hajar, A., 2010. *Structure-property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane*.
- Tsai, W.T, Yang J.M, Lai C.W, Cheng Y. H, Lin C.C, Yeh C.W, 2005. *Characterization and adsorption properties os eggshells and eggshell membrane*.
- Yu H., Tang Q., Wu J., Lin Y., Fan L., Huang M., Lin J., Li Y., and Yu F., 2012. *Using eggshell membrane as a separator in supercapacitor*.
- Zhong, Q., Wang, W., Hu, Z., and Ikeda, S., 2012. *Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of whey protein isolate at pH 7 during termal sterilization*. Food hydrocolloids. ELSEVIER.
- Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas (FIAB): <http://www.fiab.es> (junio, 2015).
- Gallos Pedraglio. 100 años de ciencia, cultura, tradición e historia: <http://www.gallospedragliofarm.com> (junio, 2014).
- Instituto de estudios del huevo: <http://www.institutohuevo.com> (junio, 2015).
- Universidad de Oviedo: <http://www.unioviedo.es> (junio, 2015).

